Université de Strasbourg — Faculté de Pharmacie

Année 1938-39 — N° 5

Contribution à l'étude comparative des méthodes de dosage de l'hémoglobine et du Fer sanguin

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 20 DEC 1938

à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

pour obtenir le Diplôme Supérieur de Pharmacien

par

André WAGNER

Docteur en Pharmacie

Licencié ès-Sciences

Pharmacien-chef de la Maison de Santé Naugeat - Limoges

Examinateurs de la thèse :

MM. Y. VOLMAR, Professeur, Président

P. CORDIER, Professeur

P. DUQUÉNOY, Maître de Conférences

SAINT-DIÉ

IMPRIMERIE AD. WEICK

1938

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548002_0068

Université de Strasbourg — Faculté de Pharmacie

Année 1938-39 — N° 5

Contribution à l'étude comparative des méthodes de dosage de l'hémoglobine et du Fer sanguin

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le.....

à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

pour obtenir le Diplôme Supérieur de Pharmacien

par

André WAGNER

Docteur en Pharmacie

Licencié ès-Sciences

Pharmacien-chef de la Maison de Santé Naugeat - Limoges

Examinateurs de la thèse :

MM. Y. VOLMAR, Professeur, Président

P. CORDIER, Professeur

P. DUQUÉNOY, Maître de Conférences

SAINT-DIÉ

IMPRIMERIE AD. WEICK

1938

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. A. SARTORY, *Doyen*, C. ✻, I. ✿, C. ❁
VOLMAR, *Assesseur*, I. ✿
PIPERAUD, *Secrétaire*, I. ✿, ⚷, ⚸

DOYEN HONORAIRE

M. JADIN, O. ✻, I. ✿ ❁

PROFESSEURS

MM.	A. SARTORY, C. ✻, I. ✿, C. ❁	Bactériologie
	LAVIALLE, ✻, I ✿, ❁	Botanique
	VOLMAR, I. ✿	Chimie organique
	GUILLAUME, ✻, ⚸, I. ✿, ❁ ..	Pharmacie galénique
	LAPP, I. ✿	Chimie analytique
	CORDIER, ✿	Pharmacie chimique
	R. SARTORY, ✿	Matière médicale

PROFESSEUR HONORAIRE

M. JADIN, O. ✻, I. ❀, ❁

COURS COMPLÉMENTAIRES

MM.	A. SARTORY	Hygiène
	LAVIALLE	Hydrologie
	VOLMAR	Chimie minérale
	GUILLAUME	Zoologie
	LAPP	Physique
	EISENMANN	Législation et Déontologie
	CORDIER	Chimie biologique
	R. SARTORY	Cryptogamie
	DUQUENOIS, Maître de Conférences	Toxicologie

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

M.	COLLARD, I. ❀, ⚸	Chimie pharmaceutique
Mme	LALLEMAND	Chimie et Physique
MM.	MEYER, ❀	Bactériologie et Parasitologie
	JAEGER	Histoire naturelle

A mon maître et Président de Thèse :

Monsieur le Professeur Y. Volmar

Directeur du Laboratoire de Chimie
de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
Membre correspondant de l'Académie de Médecine

Témoignage de respectueuse et profonde gratitude

A mes juges :

Monsieur P. Cordier

Professeur de Pharmacie Chimique
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Monsieur P. Duquénois

Maître de Conférences
Chargé du Cours de Toxicologie
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Hommage de respectueuse reconnaissance

A Monsieur le Professeur R. Marcland

Directeur de l'Ecole
de Médecine et de Pharmacie de Limoges

Témoignage de sincère gratitude

A la Mémoire de mon Père

A ma Mère

A ma Femme

Meis et Amicis

Contribution à l'étude comparative des méthodes de dosage de l'Hémoglobine et du Fer sanguin

INTRODUCTION

Les études sur le sang remontent à l'Antiquité, et si l'on doit notamment de nombreuses et judicieuses observations à Hippocrate, sa matière colorante, appelée d'abord « matière rouge », puis « hématosine », enfin « hémoglobine », n'a commencé à être connue qu'au début du siècle dernier. En 1783, Lavoisier (16) entrevit l'importance vitale de cette substance, indispensable à la fonction respiratoire; il considéra que la « partie rouge » du sang était un véritable oxyde. Des analyses chimiques détaillées du sang furent données par Thénard, Berzélius, Prévost et Dumas (36), qui analysèrent aussi ses produits de décomposition. Les opinions étaient partagées sur la présence du fer dans les cendres ; alors que des auteurs considéraient ce métal comme une impureté, d'autres, et surtout Berzélius, lui attribuèrent une grosse importance. La constitution de leur matière colorante leur resta une énigme ; Brande et Vauquelin regardaient l'hémoglobine comme « une matière animale sui generis », ne renfermant que des traces insignifiantes de fer, alors que Berzélius, Ingelhardt et Rose attribuent le fait de la couleur exclusivement à ce métal ; ils constatèrent, de même que Raspail (1), que ni l'acide gallique, ni le « prussiate ou l'hydrocyanate de potassium ne produisent dans ce liquide aucun précipité ou changement de couleur qui y annonce l'existence

(1) Thénard. — Traité de chimie, tome IV, p. 378. — 1824.
Berzélius. — Mémoire sur la composition des fluides des animaux. Ann. Chim., T. LXXXVIII, page 26.

de ce métal ». Berzélius pensait que le fer s'y trouvait réparti à l'état métallique ; mais Raspail a pu prouver que les substances organiques pouvaient soustraire une substance minérale à l'action la plus énergique d'un réactif ; il en conclut, en admettant une sorte de combinaison organique, en 1833: « Ainsi, ignorerons-nous peut-être longtemps encore à quel état se trouve le fer dans le sang, et quels sont les caractères de la matière colorante pure » (104 *bis*).

La matière colorante fut isolée par cristallisation à basse température par Huhnefeld, en 1840. Kunde, onze ans plus tard, indiqua un procédé rationnel de préparation. Cependant, c'est à Hoppe-Seyler que revient le mérite de la découverte des principales propriétés de l'hémoglobine, en particulier de ses propriétés optiques. Il démontra que l'hémoglobine, matière colorante constitutive du sang veineux se transforme au cours de la respiration en oxyhémoglobine, en absorbant de l'oxygène ; cette oxyhémoglobine devient ainsi le constituant essentiel des globules du sang artériel. Le champ de connaissances fut encore étendu par Schmidt, Valentin (1865), et surtout Stockes et Preyer (1868).

On ne savait encore doser directement l'hémoglobine, dont le taux était précisé grâce à son fer, ou grâce à l'évaluation de la quantité d'oxygène dégagée par l'oxyhémoglobine, reconnue déjà « combinaison faible ».

Hoppe-Seyler et Strassburg estimèrent à l'analyse que la proportion d'oxygène est de 78,93 cc à 118,4 cc pour 100 gr. d'oxyhémoglobine à 0° et à la pression atmosphérique. Dybowski trouva en 1866 des valeurs supérieures, de l'ordre de 156,5 cc, et Hufner sur dix recherches obtint une moyenne de 159 cc 2. Les auteurs virent que le fer était la cause de la combinaison faible de l'oxygène, sans que la relation entre le fer et la fixation du gaz ait été reconnue. Ils remarquèrent aussi que la propriété de fixer l'oxygène et de le dégager par la réduction se manifeste plus complètement in vivo que in vitro ; le méca-

nisme très complexe de la fixation d'oxygène était donc déjà pressenti, et il était reconnu que l'oxyhémoglobine n'était pas seule à y jouer un rôle. Quant au dosage de l'hémoglobine par le fer, la méthode biochimique la plus ancienne utilisée était la méthode de Pelouze : cette macrométhode consistait en une calcination massive d'au moins 100 gr. de sang défibriné, une réduction des cendres dissoutes à l'acide chlorhydrique par le zinc, puis une titration manganimétrique ; on admettait que l'oxyhémoglobine renfermait 0.42 % de fer, et l'on multipliait le chiffre trouvé par le coefficient 238 (ce chiffre devait être souvent contesté ; à peine fut-il préconisé que Zinoffsky le trouvait exagéré). Un autre procédé de dosage de l'oxyhémoglobine par volumétrie directe fut préconisé par Quinquaud : il s'agit d'une technique basée sur le principe qu'une solution d'eau de chlore titrée (grâce à l'acide arsénieux et le sulfate d'indigo) décolore sous un certain volume une quantité déterminée de matière colorante.

Une véritable révolution dans l'analyse de l'hémoglobine se produit lors de l'application des méthodes directes, chromométriques et spectroscopiques, adaptables à la médecine et la toxicologie. Les premières méthodes chromométriques sont dues à Hoppe-Seyler, à Malassez, à Hayem, à Mantagazza. Worm Muller (1876) préconisa un procédé de comparaison d'une dilution aqueuse d'hémoglobine par rapport à une couleur type déterminée à l'avance ; la quantité de sang ajoutée donne la quantité d'hémoglobine. Jolyet et Laffont, à l'aide du colorimètre de Dubosq comparèrent des solutions de sang à une solution de picrocarminate d'ammoniaque ; tous ces procédés présentaient de nombreux désavantages, vu la difficulté de l'appréciation des teintes, des solutions et de la construction des étalons de comparaison. Aussi, la première méthode chromométrique qui est restée classique et n'a pas sombré dans l'oubli est-elle celle de Gowers qui, en 1878, proposa un procédé, courant encore aujourd'hui. Les méthodes spectroscopiques eurent plus de succès. Preyer, dès 1856, se servit de

l'analyse spectrale pour la mesure de l'oxyhémoglobine. Il est parti du principe que toute dilution sanguine, ayant un pouvoir absorbant équivalent à celui d'une solution titrée, contient une proportion d'hémoglobine égale à celle de la dissolution et en outre que la solution d'oxyhémoglobine à un certain degré de dilution laisse voir le vert au niveau de la raie B. La méthode de Preyer fut largement perfectionnée par Vierordt puis surtout Hénocque, en 1883.

Dès lors, il nous faudra distinguer entre les deux séries de recherches, exécutées la plupart du temps sans contrôle réciproque, portant les unes sur le dosage chromométrique direct de l'hémoglobine, les autres sur le dosage précis de l'un de ses éléments (dans notre travail, nous nous n'envisagerons que la ferrométrie). A propos des méthodes de dosage biochimique du fer, citons les plus importantes, celles qui représentent une date dans l'évolution de la technique, et qui en même temps ont rendu d'immenses services, tant dans la recherche pure qu'en toxicologie et en médecine légale, enfin celles qui présentent un gros progrès du fait de la simplicité de leur technique. Ce sont les méthodes de :

Lapicque (1897), dosage colorimétrique aux sulfocyanures.

Bertrand (1913), dosage manganimétrique.

Fontès et Thivolle (1923), dosage molybdo-manganimétrique

Wong (1923), dosage colorimétrique aux sulfocyanures (simplifié).

Fleury et Marque (1929), dosage molybdo-manganimétrique (simplifié).

Leavell et Ellis (1934), dosage colorimétrique à l'acide thioglycolique.

Lasausse (1936), dosage iodométrique.

En hématologie, de nombreux appareils furent construits à la suite des publications de Gowers; parmi les méthodes,

importantes en tant que méthodes cliniques, nous pouvons citer surtout :

a) En spectroscopie : les méthodes de Hénocque (1883) et de Williamson (1916) ; dans ce dernier procédé ce n'est plus l'œil humain, organe imparfait, qui apprécie le « phénomène des deux bandes égales », mais une cellule photoélectrique reliée à un galvanomètre dont les déviations de l'aiguille doivent traduire la concentration en oxyhémoglobine.

b) En chromométrie : il nous faut signaler les procédés de Tallqvist, de Haldane (1900), de Sahli (1905), de Newcomer (1916), et de Hallion et Borrien (1934).

Munis de ces données, dans notre travail nous avons choisi pour but une étude comparative des méthodes de dosage publiées. A priori, nous n'en rejetons aucune, même si elles sont très critiquées ; bien au contraire, une légère modification de la technique peut les rendre excellentes ; tout en examinant leurs défauts nous cherchons, en nous servant de l'expérience des différents auteurs, à les modifier dans le sens d'un perfectionnement, et d'autre part nous serons amenés à présenter nous-mêmes une méthode de dosage ferrométrique de l'hémoglobine que nous désirons à la fois simple, pratique et précise. Un tel travail devra être exécuté à la fois sur des solutions-étalon de titre exact, identiques pour toutes les déterminations, et comme nous travaillons sur le tissu sanguin, il faudra se servir du même liquide pour chaque série de dosages. Nous avons été frappés de la préférence manifestée par les milieux médicaux pour l'hémoglobinimétrie directe, alors que la raison nous oblige à nous adresser d'abord aux méthodes ferrométriques considérées comme des méthodes de référence ; nous verrons si les critiques adressées, croyons-nous injustement à ces derniers procédés, sont justifiées. Lorsque nous aurons achevé cette étude comparative systématique, nous poursuivrons dans des travaux ultérieurs les problèmes que pose la présence du fer dans l'organisme.

Avant d'aborder l'exposé même de notre travail, qu'il nous soit permis d'adresser ici, à notre estimé Maître, Monsieur le Professeur Y. Volmar, Assesseur auprès de M. le Doyen de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg, Membre correspondant de l'Académie de Médecine et Directeur du Laboratoire de Chimie, l'expression de notre très vive et respectueuse reconnaissance pour avoir bien voulu accepter la présidence de notre thèse. Depuis de nombreuses années nous avons suivi son enseignement, et à deux reprises nous avons eu l'honneur d'avoir été agréé à son laboratoire. De ce passé, nous conserverons un souvenir profond à la fois de la haute autorité de son enseignement et des principes qu'il nous a inculqués, de la compétence avec laquelle il a dirigé nos efforts et, surtout, de la bienveillance et de la sympathie dont il nous a sans cesse entouré. Nous resterons incapable d'acquitter envers lui notre dette de reconnaissance, mais nous tenons cependant à l'assurer de toute notre gratitude, de notre dévouement et de notre haute admiration.

Nos sentiments de gratitude et de vive reconnaissance s'adressent également à Messieurs les Professeurs P. Cordier et Duquénois, Maître de Conférences, pour l'honneur qu'ils nous ont fait de participer à notre jury de thèse et les nombreuses directives et les conseils éclairés qu'ils nous ont prodigués au cours de nos recherches et dont nous les remercions bien sincèrement.

Notre gratitude s'adresse aussi à Monsieur le Professeur Marcland, Directeur de l'Ecole de Médecine et de Pharmacie de Limoges, pour la grande bienveillance et la sympathie dont il nous a témoigné dès notre arrivée à Limoges.

Enfin, nous n'oublierons pas d'exprimer nos sentiments de reconnaissance à Monsieur R. Bonnet, Professeur à l'Institut de Physiologie de la Faculté des Sciences de Strasbourg, pour ses instructives données d'ordre physiologique.

PREMIÈRE PARTIE

Chapitre Premier

Etude de la constitution et du rôle de l'Hémoglobine

Avant d'entreprendre l'étude des méthodes d'appréciation et de dosage de l'hémoglobine et du fer sanguin, voyons d'abord les propriétés du pigment et la constitution moléculaire qui lui est attribuée.

Rappelons brièvement nos connaissances à ce sujet et étudions successivement :

a) La constitution et la formule probable de l'hémoglobine (que nous désignerons par la suite par le symbole conventionnel Hb).

b) Le rôle de l'H*b* et du fer sanguin.

I. - Constitution de l'Hémoglobine

La constitution de ce pigment étant déterminée d'après ses propriétés physiques et chimiques, étudions ces dernières.

Polonovski et Lespagnol (17) indiquèrent un procédé d'extraction de l'H*b* à partir du sang défibriné. Ce sang est centrifugé en présence de sérum physiologique ; ce lavage à 0° est effectué à plusieurs reprises ; la purée de globules extraite et lavée à l'éther est dialysée durant 8 jours à 0° dans des sacs de collodion contre une solution saturée de CO^2 ; l'hémoglobine

recueillie est traitée à l'oxygène et HbO^2 formé cristallise avec 2 fois son poids d'eau à + 37°.

A l'état solide, l'H*b* se présente en cristaux rouges du système rhombique ; ces cristaux ne restent pas stables, et se désagrègent en donnant naissance à une seconde forme de cristaux monocliniques et dichroïques. En lumière blanche, certains d'entre eux semblent incolores (Fraser 135), car ils sont orientés de telle sorte qu'ils présentent à la lumière incidente la direction de leur minimum d'absorption ; en lumière polarisée, pour deux positions de la platine tournante, ils présentent une coloration rouge violacée ; grâce à cet examen, on se rend compte que les cristaux incolores d'H*b* doivent leur aspect à une orientation particulière qui met en évidence leur dichroïsme très prononcé.

En solution aqueuse, l'Hb se comporte comme un colloïde ; son point isoélectrique a été déterminé au *p*H = 6,8. Alors que l'oxyhémoglobine, HbO^2 réagit à la façon d'un acide faible ($K = 5 \cdot 10^{-7}$), l'H*b* est neutre. Le pigment nous intéressera par ses propriétés optiques, son spectre d'absorption :

L'H*b* présente dans le spectre visible à l'œil une bande sombre située dans la région verte, très intense au niveau de la longueur d'onde

$$\lambda = 5.400 \text{ unités A.}$$

L'HbO^2 présente 2 bandes ayant leur maximum d'intensité à

$$\lambda\, 1 = 5.769 \text{ unités A.}$$
$$\lambda\, 2 = 5.404 \text{ unités A.}$$

Les bandes d'absorption dans le spectre ultra-violet sont encore bien plus dignes d'intérêt, car elles caractérisent chaque hémoglobine spécifique.

A l'état naturel, l'H*b* existe dans les hématies du sang des Vertébrés, sauf l'Amphioxus ; dans le sérum on croyait n'en pas trouver. Mais Fontès et Thivolle (53), lors de recherches

sur la présence du fer dans ce liquide y ont trouvé des traces, de l'ordre de $\frac{1}{100}$ de mg, soit environ 2,63 mg H*b*. Il n'est encore pas permis de dire que ces traces représentent une proportion nécessaire et constante, parce que pratiquement on pourrait admettre aussi qu'elles sont dues à l'impossibilité de séparer tout à fait les globules du sérum.

La solubilité de H*b* et de H*b*O² étant faible dans l'eau, on ne peut guère admettre leur état en solution dans les globules. R. Fabre (18) estime qu'ils sont à l'état de solution sursaturée, et sans doute à l'état libre; du fait des propriétés acides de H*b*O², une partie de ce corps serait combinée aux éléments alcalins présents dans la cellule.

Au point de vue chimique. nous distinguerons les propriétés de H*b* d'après :

a) Ses réactions d'addition sans modification de constitution.

b) Ses réactions de combinaison sans changement de la structure moléculaire.

c) Ses réactions de dégradation.

A. - Réactions d'addition sans modification de constitution

La réaction la plus importante sera la fixation d'oxygène et la formation d'oxyhémoglobine. L'hémoglobine se combine à l'oxygène suivant la tension de ce gaz dans l'atmosphère offerte ;

$$\text{la réaction } Hb + O^2 = HbO^2$$

est réversible, et se trouve régie par la loi d'action des masses. Comme dans le sang existent d'autres éléments, de nombreux facteurs sont appelés à jouer leur rôle et J. Barcroft (24) et ses

élèves ont montré l'influence favorisante du milieu alcalin pour la formation de l'oxyhémoglobine, l'influence de CO^2 qui exige une quantité 2 fois plus grande d'oxygène pour amener le milieu à sa saturation, enfin les modifications de la forme de la courbe de saturation de l'H*b* dues aux éléments salins du sérum. Cette courbe n'est plus une hyperbole équilatère, telle qu'elle a été obtenue avec les composés chimiques purs ; CO^2 et les acides ont fait varier les valeurs de la constante d'équilibre, et les sels ont dû faire varier le degré d'agrégation des molécules. L'hémoglobine fixe une molécule d'oxygène pour un atome de fer ; un gramme d'hémoglobine absorbe ainsi 1 cc, 420 à 0° et à 760 mm H*g* ; cette fixation porte sur le fer par formation d'un peroxyde instable.

Cette réaction-là est évidemment capitale pour l'entretien de la vie, car elle précède nécessairement le transport sur les tissus de l'oxygène indispensable à la nutrition.

Selon le même mode, c'est-à-dire en se portant sur le fer par une réaction d'addition, agissent divers autres gaz. L'oxyde de carbone se fixe sur l'H*b* de la même manière, en donnant de la carboxyhémoglobine H*b*CO ; comme l'affinité de CO pour H*b* est supérieure à celle de l'oxygène, il s'ensuit que la combinaison est bien plus stable, quoique réversible, et que l'oxyde de carbone déplace l'oxygène de l'oxyhémoglobine ; la réaction est régie également par la loi d'action des masses, en fonction de la tension de CO offerte ; les sels et en général les autres éléments constitutifs du sang ne modifient en rien la courbe de saturation donnée par les masses réagissantes pures ; toutefois, les constantes d'équilibre ne sont pas les mêmes pour toutes les espèces animales, du fait de la différence de constitution des H*b*. L'hémoglobine se comporte enfin envers HCN à l'état gazeux, NO^2 et H^2S de la même façon, en donnant respectivement de la cyanhémoglobine, de l'H*b* oxynitrique et de la sulfhémoglobine,

B. - Réactions de combinaison avec changement de la structure moléculaire.

Réactions d'oxydation et de réduction.

Alors que le gaz oxygène se fixe sur l'hémoglobine en donnant un composé d'addition labile, les agents chimiques oxydants agiront en modifiant la structure de la molécule ; la structure nouvelle va paralyser tout rôle physiologique. Dans l'Hb et l'HbO^2 , le fer se trouve à l'état ferreux ; les oxydants légers le feront passer à l'état ferrique, et la fixation d'oxygène ne sera plus possible. Envers l'Hb et l'HbO^2 la réaction sera la même ; nous serons en présence du même changement de valence, avec cette différence toutefois qu'avec l'HbO^2, l'oxygène déjà fixé sera chassé. Nous n'avons plus à faire à une oxydation par oxygénation, mais elle se ramènera à une augmentation des charges positives du fer.

Examinons schématiquement les équations établies par Conant. Soit le ferricyanure de K l'agent oxydant ; exprimons par P le groupe chromogène prosthétique, et S la matière albuminoïde, la globine à laquelle il est lié dans la molécule d'Hb.

$$Fe(CN)^6K^3 + P - Fe - S + HOH \longrightarrow$$

$$Fe(CN)^6K^3H + P - Fe^{+++}\begin{matrix}\diagup OH \\ \diagdown S\end{matrix}$$

Avec HbO^2 :

$$Fe(CN)^6K^3 + P - Fe\begin{matrix}\diagup O \\ \diagdown O \\ \diagdown S\end{matrix} + H^2O \longrightarrow$$

$$Fe(CN)^6K^3H + P - Fe\begin{matrix}\diagup OH \\ \diagdown S\end{matrix} + O^2$$

Le dégagement d'oxygène est quantitatif, et c'est précisément sur le principe du volume d'oxygène que l'on a échafaudé des méthodes très précises de dosage d'hémoglobine (méthode de Haldane).

Le nouveau composé obtenu est la méthhémoglobine dont les propriétés et les méthodes de détermination ont été étudiées par P. Ducou (8). Ce produit que Hoppe-Seyler, en 1864, a déjà trouvé dans le sang, Conant l'obtient en exposant à l'air une solution alcoolique à 5 % d'oxyhémoglobine à 37° durant 10 jours ; il fut considéré longtemps comme un peroxyde d'hémoglobine, puis comme un isomère de l'oxyhémoglobine. Mais Nicloux et Roche montrèrent qu'en réalité il s'agit d'un sous-oxyde, vu que par action des réducteurs, on lui soustrait deux fois moins d'oxygène qu'à l'H*b*O^2. La méthhémoglobine est incapable de jouer le moindre rôle dans la fonction respiratoire.

Si l'H*b* est facilement oxydable, si d'autre part il est à la fois transformable en un peroxyde et en un sous-oxyde, on peut considérer que dans le milieu intérieur de l'organisme, il joue lui-même un rôle d'oxydant ; sans doute n'est-il pas seul à le jouer, car il ne réalise pas à lui seul le transport et la fixation de l'oxygène sur les tissus. Mais il a bien, comme les peroxydases, un rôle d'autooxydateur ; devenu un peroxyde labile, au contact des tissus, dont le *r*H se trouve dans la zone réductrice, il cède aisément son oxygène sur le tissu, qui fera fonction d'accepteur ; ainsi ce ne sera plus un simple réservoir d'oxygène comme on le croyait d'abord. Dans la suite, nous serons amenés à étudier de plus près le mécanisme de cette action.

C. - Réaction de dégradation

Dissociation de la molécule d'hémoglobine

De même que pour les matières albuminoïdes, qui constituent un édifice de structure complexe, de nombreux auteurs, à la faveur d'hydrolyses ménagées ou d'hydrolyses oxydatives, ont recherché la constitution possible de l'H*b*. En particulier, Nencki, Küster, H. Fischer et ses collaborateurs, enfin Conant se sont attachés à ce problème. Par l'analyse élémentaire, on retrouve

tous les éléments constitutifs des protides, c'est-à-dire C, H, O, S, N, et en plus du fer ; vu la constance de son taux (0,33 %), on considère que le pigment n'en contient qu'un atome ; par des mesures de cryoscopie et par des méthodes courantes de recherche de poids moléculaires, on admet la formule brute :

$$C^{758}H^{1203}O^{218}N^{195}S^{3}Fe = 166{,}669 \text{ (R. Fabre)}$$

Par une hydrolyse ménagée, on scinde la molécule en 2 blocs, le premier très petit par rapport à l'autre : l'hémochromogène et la globine ; le premier est un groupe prosthétique tétrapyrrolique ferrugineux, l'autre un protide. Toutes les hémoglobines possèdent le même groupe prosthétique, qui est à la fois le groupe porteur de la couleur et le support des propriétés oxydatives particulières ; mais le protide constitutif varie d'une espèce à l'autre ; il est même un élément caractéristique et spécifique d'une espèce. Pour la même raison l'H*b* présente dans le muscle diffère de celle du sang. J. Roche et P. Dubouloz (112 bis) ont montré les propriétés caractéristiques qui permettent de différencier les diveres sortes d'H*b*. L'étude des spectres dans l'UV a montré que si pour les diverses sortes d'H*b*, ces spectres sont superposables (en raison de la propriété d'absorption de ces rayons revenant surtout au groupe prosthétique), il n'en est plus de même si on réalise les mêmes spectres avec les globines seules, ils ne peuvent alors plus du tout se superposer. Leur teneur en acides aminés varie aussi, Schenk (16 bis), l'a déterminée sur diverses hémoglobines.

Voici les pourcentages les plus importants d'entre eux :

	Tyrosine %	Tryptophane %	Arginine %	Histidine %
H*b* de Bœuf	3,25	2,30	3,44	7,82
— Cheval	3,38	2,41	3,54	7,94
— Chien	3,49	2,92	3,39	8,25
— Cobaye	2,59	1,90	3,46	8,85
— Homme	2,80	2,26	3,46	8,62
— Lapin	3,69	2,95	3,48	8,62
Mouton	3,69	2,65	3,62	7,99
— Porc	3,09	2,23	3,47	7,82

Les différences sont encore plus prononcées lorsqu'on examine les hémoglobines que contiennent certains invertébrés.

J. Barcroft (25) après avoir rappelé les propriétés qui diffèrent à propos des diverses Hb, c'est-à-dire la forme cristalline, la solubilité, la facilité de cristallisation, le caractère du spectre, l'affinité pour O^2, enfin les coefficients de température de leurs affinités pour chacun de ces gaz pris à part et pour le partage de Hb entre O^2 et CO, conclut que ces différences ne tiennent pas aux hématines qui sont identiques, ni à une différence dans le mode de liaison ; il ne peut s'agir donc que d'une différence dans la teneur en globines. Il a montré aussi l'importance et la signification de l'affinité pour l'oxygène, car plus le degré des échanges métaboliques est élevé, plus la pression à laquelle le sang peut céder son oxygène aux tissus doit être élevée ; de même à des animaux à métabolisme faible et vivant dans une atmosphère à oxygène sous pression faible, il faut une H*b* capable de fixer O^2 à faible pression.

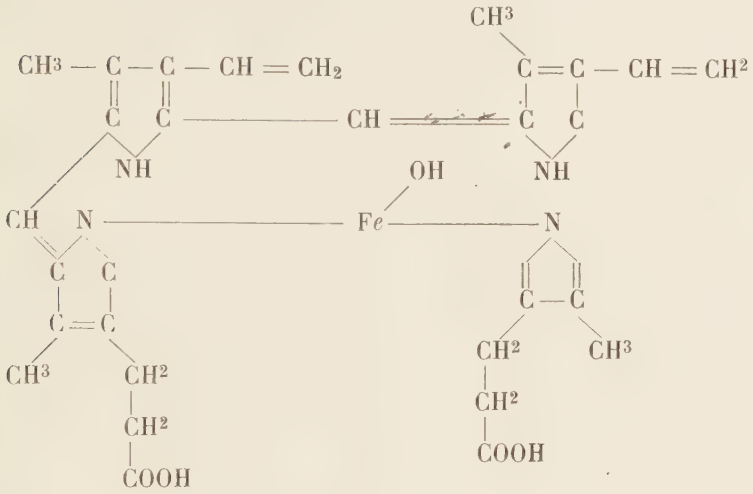
Roche et Dubouloz ont montré qu'intraspécifiquement la composition des globines varie avec l'âge ; en conséquence, l'Hb a une constitution qui n'a rien de constant, même pour une même espèce.

Tout celà confirme donc la spécificité des hémoglobines. La globine fut longtemps considérée comme un histone et, fait curieux, l'acide aminé constitutif le plus important est non l'arginine, mais l'histidine.

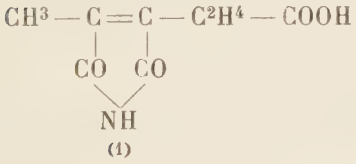
L'hémochromogène, par les agents oxydants, donne naissance à l'hématine. On l'obtient par action d'une solution acétique saturée de N*aCl*, N*aBr* ou N*a*I sur H*b*O^2; on élimine ensuite l'excès des ions *Cl*, *Br* ou I; le produit se présente en cristaux caractéristiques (cristaux de Teichmann). La réaction sert d'ailleurs en médecine légale pour déceler la présence de sang. Dans cette hématine, le fer est à l'état trivalent ; combinée

à un groupe prosthétique bien défini, elle donne naissance à un pigment, le cytochrome de Keilin qui joue un rôle capital dans les oxydations intracellulaires de l'organisme.

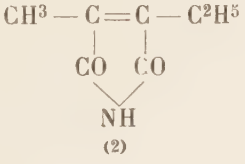
On s'accorde à donner à l'hématine la formule suivante :



La présence de 2 carboxyles et des doubles liaisons sous forme de groupe vinyl fut démontrée d'une part à l'aide des réactions d'estherification, d'autre part à l'aide des réactions de fixation de brome. Niniki et Zaleski purent éliminer le fer à l'aide d'une réaction combinée de réduction et de déplacement du métal ; ils utilisèrent l'acide iodhydrique puis l'acide acétique en présence de phosphore rouge ; ils obtinrent la mésoporphyrine et sa leucobase, le mésoporphyrinogène ; par décarboxylation ils aboutirent à l'étioporphyrine. Par oxydation, l'étioporphyrine donne de l'acide hématique(1) et de la méthyléthylmaléinimide(2) :



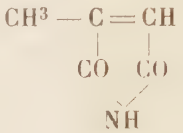
(1)



(2)

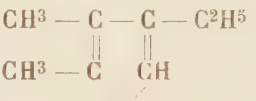
D'après le rendement de l'oxydation, on admet que l'hématine est constituée de 4 noyaux pyrolliques.

Les produits de dégradation de l'hématine se révèlent très nombreux. Les 2 restes vinyles se détachent les premiers lors de la putréfaction, il reste de la deutérohémine, et à la suite du fer; de la deutéroporphyrine, laquelle par oxydation donne naissance à de l'acide hématique et de la citraconimide :

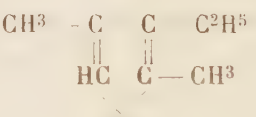


Enfin, en dégradant la molécule par distillation des produits de réduction, on aboutit à des acides pyrrolcarboxyliques et des bases pyrolliques dont principalement :

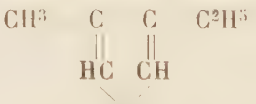
l'hémopyrrol



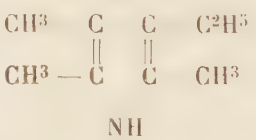
le cryptopyrrol



l'opsopyrrol



le phyllopyrrol



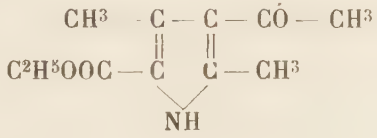
et leurs acides pyrrolcarboxyliques correspondants.

D'autre part la constitution de l'hématine est confirmée par des réactions de synthèse qui consistent, d'abord en une synthèse

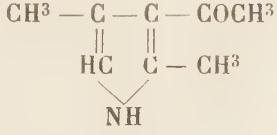
de noyaux pyrroliques, puis en une condensation des noyaux, à l'adjonction du métal fer qui apporte au noyau porphyrinique la propriété de fixer l'oxygène.

I. - Synthèse des alcoylpyrrols et de leurs acides

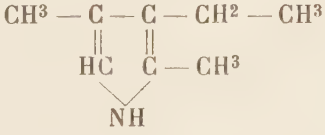
On part de l'acétylacétone et de l'aminoacétylacétate d'éthyle pour bâtir le cycle du pyrrol :



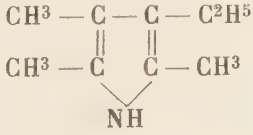
Par saponification on obtient :



Par la réaction de Kischner-Wolff, on réduit, en se servant de l'action de l'alcoolate de sodium sur l'hydrazone, et on obtient ainsi du cryptopyrrol :



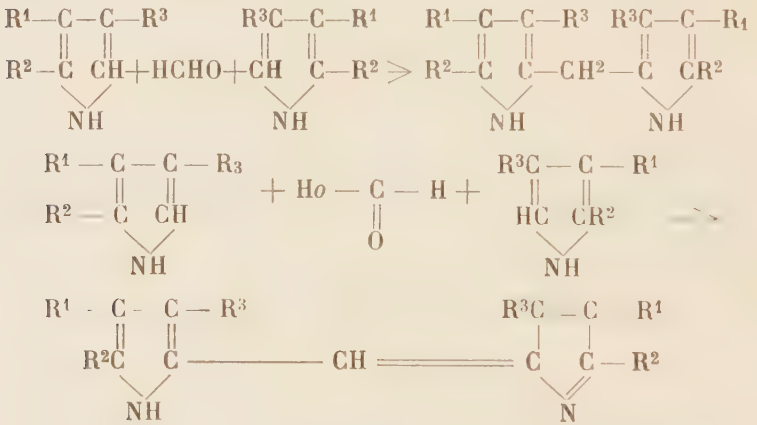
Dès lors, le passage aux autres alcoylpyrrols présentera, quoique les réactions restent encore très délicates, moins de difficulté. On passe directement du cryptopyrrol monobromé au phyllopyrrol par action du methylate de sodium.



Le chlorocarbonate d'éthyle sur le dérivé magnésien du cryptopyrrol, puis l'action combinée des halogènes et du chlorure de thionyle permettent de passer à l'opsopyrrol ; de là, par simple méthylation, on aura synthétisé à son tour l'hémopyrrol. La synthèse des acides pyrrolcarboxyliques s'opère par des voies analogues.

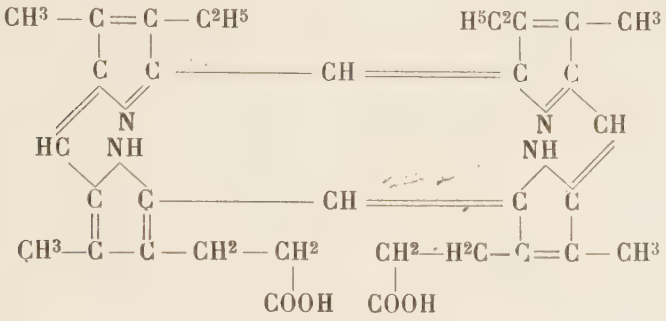
2) Condensation des noyaux

Deux noyaux pyrroliques peuvent se condenser à l'aide d'un groupé — CH = qui permet leur réunion ; l'agent de condensation pourra être l'aldéhyde formique avec lequel on obtiendra des dipyrrilméthanes, ou bien l'acide formique qui mènera aux dipyrrilméthènes.



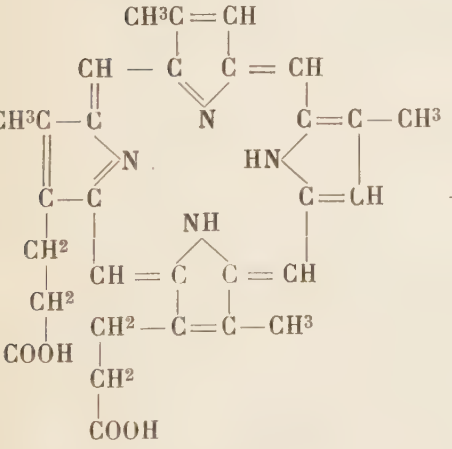
Dans certaines conditions, l'acide formique permet même de réaliser d'emblée une synthèse de tétrapyrrylméthènes ou porphyrines. Toutefois, cette synthèse sera mieux réalisée en employant des dipyrrylméthènes α bromés ou α méthylés en présence d'un excès d'acide succinique ; ou bien en combinant des dipyrrylméthènes α bromés avec des dipyrrylméthènes bromés. On en arrive ainsi au groupe de noyaux tétrapyrroliques

caractéristiques de la structure de l'hématine, dont il existe d'ailleurs de nombreux isomères.

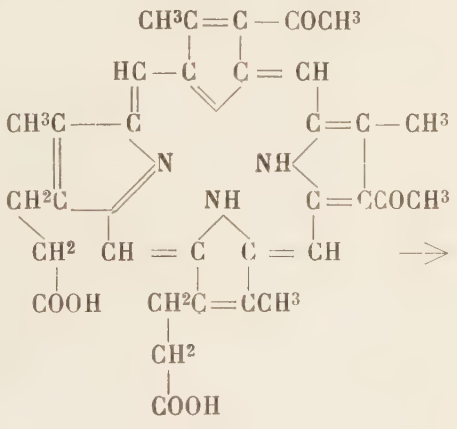


3) Introduction du fer

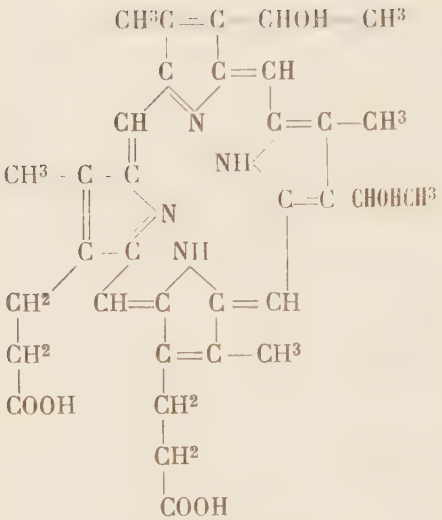
Fischer, en 1928, synthétisa l'hématine. Il partit de la deutéroporphyrine ; par diacétylation, il obtint de la diacétyldeutéroporphyrine, puis par réduction de l'hématoporphyrine, les fonctions cétoniques étant transformées en fonction alcool secondaire; puis par déshydratation dans le vide, il aboutit à la protoporphyrine.



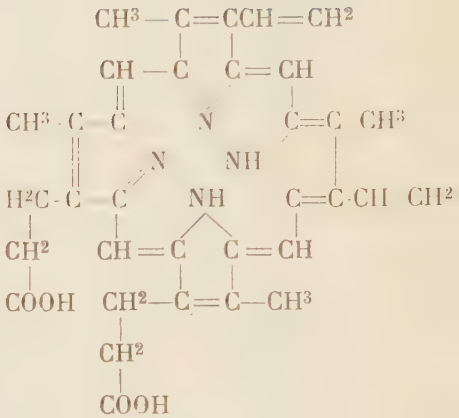
deutéroporphyrine



diacétyldeutéroporphyrine



hématoporphyrine



protoporphyrine

Par introduction du perchlorure de fer, Fischer termina sa synthèse de l'hématine, dont la structure et la formule sont ainsi définies. Le groupe prosthétique constitutif de la molécule d'hémoglobine est donc connu, grâce à ces remarquables travaux, et ainsi est réalisée une étape importante de l'étude de la constitution de ce pigment.

En dehors de l'hémoglobine, il existe dans l'organisme d'autres complexes dans lesquels est engagé l'atome fer ; on les retrouve par des méthodes de détection histochimique. Ces méthodes reposent sur le principe de 3 réactions :

$$Fe^{+++} + Fe(CN)^6K^4 \longrightarrow Fe^4[Fe\,CN]^3$$

Précipité de bleu de Prusse

$$Fe^{+++} + (NH^4)^2S \longrightarrow FeS$$

Précipité noir

$$Fe^{II} + K^3Fe(CN)^6 \longrightarrow Fe^3[Fe(CN)^6]^2$$

Bleu de Turnbull

L'hémoglobine n'est pas décelable, on ne retrouve que des complexes imparfaits. Les meilleures méthodes de détection sont celles de Grohe (58) et Perls (103) qui utilisent la première réaction. Katsunuma (77) annonça une méthode, à l'aide des sulfures alcalins. Elle peut être considérée comme plus sensible, car l'auteur a pu déceler ainsi des granules ferrugineux dans le protoplasme de la plupart des cellules vivantes, chez le lapin et chez l'homme. Mais pas plus que les précédentes elle ne permet un dosage, vu qu'une grosse partie du fer reste dissimulée, soit à l'état libre et colloïdal, soit engagée dans un complexe parfait, elle ne touche que le fer ionisé et le fer combiné à une matière albuminoïde (par exemple : la ferratine de Schmiedeberg et l'hématogène de Bunge).

Un problème important vient d'être résolu grâce à ces méthodes, celui de la présence dans le sang de composés ferriques autres que l'hémoglobine. La discussion était vive, et les opinions partagées au sujet du fer du sérum. Bunge, Haussermann, et surtout Abderhalden (21), émirent l'hypothèse de l'absence totale de fer. Zizine, après avoir essayé de nombreuses méthodes de dosage de fer, et en avoir préconisé une à l'alloxane, conclut en disant que « le sérum ne contient pas de fer ». A ces conclusions, il y a lieu d'opposer les recherches histochimiques de G. Barkan (26), et surtout les travaux de Fontès et Thivolle (53).

En théorie, il serait presqu'impossible d'admettre que le fer maintenu en réserve dans le foie et la rate fût de suite, sans solution de continuité, fixé sur l'hématie ; il doit donc exister une forme circulante du fer « capable d'apporter des organes de réserve aux cellules hématopoïétiques, l'élément minéral ». Fontès et Thivolle minéralisèrent une masse de 500 cc de sérum de cheval, en se servant de NO^3Mg comme accélérateur de combustion, puis dosèrent le fer dans les cendres ; ils trouvèrent une teneur variant de 1,92 à 2,08 mg de fer par litre. Durant la période de convalescence de l'anémie, cette teneur s'abaisse à 1 mg, en raison de la grande énergie de fixation du fer que manifestent les hématies.

Grâce aux méthodes histochimiques encore, Saneyoshi (115) décela 0,104‰ environ de fer par substance sèche de leucocytes chez le lapin, 0,127 chez le veau et 0,121 chez le chien ; la teneur en fer des lymphocytes et des polynucléaires est environ la même.

En définitive, le fer se trouve dans le sang sous forme d'hémoglobine, dans la proportion approximative de 996‰ et sous d'autres formes mal définies dans la proportion de 4‰.

II. - Rôle de l'hémoglobine et du fer sanguin dans l'organisme.

Il nous a paru intéressant de rappeler et de résumer nos connaissances actuelles sur l'origine, la genèse de l'hémoglobine et sa destinée. Nous y attacherons d'autant plus d'importance qu'à la suite de nos travaux actuels, nous avons l'intention de contribuer à tirer de nouvelles données sur ce sujet. Comment la molécule d'hémoglobine est-elle élaborée, à l'aide de quelles synthèses, comment ont lieu la fixation du fer et son élimination ?

Le mécanisme de la synthèse invivo de l'H*b* est encore resté bien obscur. La physiologie nous enseigne que l'H*b* se forme dans les hématies nuclées élaborées dans la moelle osseuse ou parfois dans la rate. Le fer ingéré est retenu dans le foie pour y constituer la réserve martiale ; la forme sous laquelle s'y trouve le fer semble être un sesquioxyde hydraté colloïdal, caractéristique par ses granulations dans les cellules de Kuffer du foie, et les cellules de la pulpe splénique. On les a reconnues par les méthodes histochimiques précitées. Lorsque ces dépôts sont excessifs, le symptôme pathologique de sidérose est créé. Le fer passant probablement en solution, va se fixer sur l'hématie, grâce à l'action catalytique du cuivre, présent lui aussi dans les mêmes cellules que le fer. Le dernier métal semble indispensable : Elvehjem et Shermann (45)

ont montré que l'addition de fer minéral à une ration lactée productrice d'anémie n'entraîne qu'une accumulation ferrugineuse dans le foie et la rate ; il n'y a pas utilisation ; le fer ne sera mobilisé qu'à la suite de l'adjonction d'un sel de Cu. Aucun autre métal ne peut remplacer le *Cu*, tel qu'il résulte des travaux de J. Waddell, H. Steenbock et E. B Hart (128).

D'autre part, comme acides aminés indispensables à l'édification de la molécule d'H*b*, il convient de citer avant tout l'histidine et le tryptophane.

La destruction des hématies a lieu dans la rate et elle porte sur 1/60 des globules ; elle peut avoir lieu aussi insitu ; elle s'opère par phagocytose. Le fer est capté et mis en réserve par le foie ; la plus grosse partie sera éliminée par les matières fécales ; l'urine n'en renferme que 0 mg. 5 °/₀₀ environ, provenant du fer circulant.

Le bilan moyen s'établit comme suit, chez l'homme :

Besoin quotidien en fer : 0 g. 015.

Elimination quotidienne par les fèces : 0,008.

Elimination quotidienne par les urines : 0,0005.

Munis de ces données quantitatives, examinons les problèmes posés par le fer sanguin, et que l'on est encore appelé à résoudre. Les principaux d'entre eux sont :

a) Un problème d'ordre médical : relation entre *Fe* et volume globulaire, et valeur globulaire.

b) Un problème biochimique : relations entre le fer et les autres métaux dans le sang.

c) Des problèmes de physiologie : celui de la synthèse de l'hémoglobine : le problème de la couverture des besoins de l'organisme en fer et en acides aminés indispensables à l'édification de la molécule d'hémoglobine : le problème du rôle de l'hémoglobine et son mode d'action.

Le problème des rapports entre la teneur en fer et la valeur globulaire intéresse la médecine pour le diagnostic des anémies ; les unes sont à valeur globulaire normale et présentent un double déficit de concentration en hémoglobine, et par le nombre des globules ; dans d'autres au contraire, la valeur globulaire est trop élevée. soit par suite d'un déficit dans le nombre des hématies, soit par suite d'une concentration exagérée en hémoglobine d'un petit nombre de globules.

W. L. Dulière et M. Adant,(1) lors d'une étude sur la relation entre le volume globulaire et la concentration en fer, ont estimé qu'avec « une approximation de cinq à six pour cent, on peut déduire du volume globulaire du sang veineux la concentration en fer, la concentration en hémoglobine et la capacité de fixation d'oxygène. Dans de nombreux cas aussi, la valeur de l'hématocrite fournit des indications sur le nombre des globules rouges »

Le problème biologique du rapport entre le fer et les autres métaux dans le sang, nous semble à peine abordé. A. Blanchetière et H. Cardot (137) ont dosé les ions *Na*, K et *Ca* dans le sang du chien et ils ont trouvé les valeurs suivantes exprimées en mg par 100cc de sang :

Na	K	Ca
285	20,7	
280,5	42,1	10,27
248	20	
290	39	

Comme le potassium est surtout localisé dans les globules et le sodium dans le sérum, le fer peut il jouer un rôle de répartition entre ces 2 métaux ? Est-il capable de fixer ou de favoriser la fixation élective du potassium sur les globules, comme le *Ca* permet l'entrée du fer dans les noyaux porphyriniques ? La question n'est pas encore résolue, nous nous proposons dans des travaux ultérieurs d'essayer de l'élucider.

(1) W. L. Dullère et M. Adant, Bull. Soc. Chim. Biol. T. XVIII n° 11, page 1589 — 1936.

Le problème le plus vaste auquel se sont attachés à la fois les biochimistes et les physiologistes est sans conteste celui de la genèse de l'hémoglobine. Pour le résoudre, la méthode la plus rationnelle nous semble :

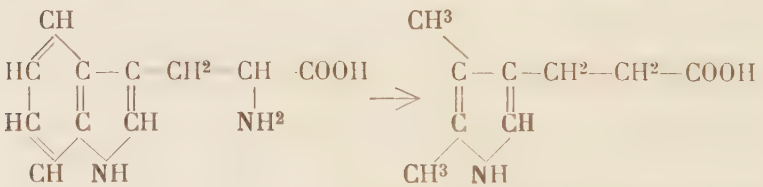
d'observer des cas d'anémie pathologique : examiner ses causes et voir si par adjonction à la ration ordinaire d'un élément indispensable à la synthèse de l'H*b*, on aboutit à une guérison rapide. Cependant, comme les maladies sont toujours très complexes, et que de nombreuses causes de perturbation dans les fonctions de l'organisme peuvent survenir, dues non à l'anémie elle-même, mais à des lésions d'organes, il est bien préférable de créer chez des animaux des anémies expérimentales. On réalise ces dernières par des saignées fréquentes, par des injections de phénylhydrazine ou ce qui nous semble préférable, en ne donnant à ingérer que du lait, qui ne renferme que des traces de fer. Lorsque l'anémie sera déclarée, on ajoutera soit isolément, soit conjointement, le ou les éléments dont on veut étudier l'efficacité. C'est ainsi que l'on est arrivé à évaluer le besoin en fer ; le fer n'est pas suffisant, il est nécessaire de lui ajouter des composés cycliques que l'organisme animal (incapable, rappelons-le, de construire de toutes pièces des noyaux à l'aide de simples chaînes linéaires organiques) transformera en noyaux porphyriniques. A cet effet, de nombreux composés furent présentés, en particulier les extraits de foie de veau de Whipple ; ces extraits étant riches, comme l'H*b*, en histidine et en tryptophane, des auteurs cherchèrent à réaliser des guérisons rapides d'anémies provoquées à l'aide de ces acides aminés seuls, le besoin en fer étant largement couvert. Okagawa et Tatsui injectèrent à des chiens normaux une dose suffisante de phénylhydrazine pour faire passer le taux d'Hb de 35 à 45 % ; par addition à des rations normales de tryptophane, ils réalisèrent leur guérison en 18 jours ; néanmoins, la résurrection ne s'observe pas chez les animaux dératés ; la rate interviendrait donc dans la synthèse de l'hémoglobine.

Matsuoka et Nakao s'adressèrent pour cette réfection au méthyltryptophane ; il s'est montré plus actif, sans doute en raison de la stabilité bien plus grande du noyau pyrrolique inséré dans le noyau indol.

Enfin, Fontès et Thivolle (54) trouvèrent le mélange de substances, capable d'assurer au minimum de dose la réfection maxima : celle-ci se produit par adjonction à la ration de sels de fer, de cuivre et de manganèse, d'acides aminés considérés comme hématogènes, le tryptophane et l'histidine, et en plus la totalité des acides aminés contenus dans la molécule de globine.

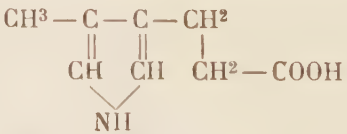
Leur produit constitue un globinate de fer, cuivre et manganèse ; il s'est révélé plus actif que les extraits de foie, car le fer et le cuivre s'y trouvent sous une forme plus directement assimilable.

Au point de vue chimique, nous en sommes encore réduits à des hypothèses sur la synthèse in vivo de l'hémoglobine. Rapprochons les formules du tryptophane et celles des acides hémopyrrolcarboxylique et opsopyrrolcarboxylique.



acide hémopyrrolcarboxylique

Par déméthylation, celui-ci se dégrade en acide opsopyrrolcarboxylique.



Un dernier problème délicat reste posé, sur le mode d'action de l'hémoglobine ; celle-ci une fois constituée, comment

sera-t-elle appelée à jouer son rôle de transport de l'oxygène ? A ce sujet, nous savons que c'est à la fois un réservoir et un fixateur d'oxygène ; cette fixation, on croit, en se basant sur les propriétés peroxydasiques de l'Hb, qu'elle se fait par auto-oxydation, puis transport sur un tissu qui serait accepteur d'oxygène.

Donc l'H*b* agit à la fois comme catalyseur et comme peroxydase. L'activité catalytique a été étudiée par Dufraisse et Horclois (43); ces auteurs ont montré que H*b* se comporte de même manière que le fer catalytique, il manifeste le phénomène de la parenté des catalyses inverses, c'est-à-dire l'aptitude à fonctionner comme anti ou comme pro-oxygène; dans ces molécules le fer a une activité catalytique variable en intensité et en signe, selon la forme chimique et la nature des matières auto-oxydables (dans l'organisme, il s'agit des tissus) auxquels on l'oppose ; le reste de la molécule dans laquelle est engagé le fer exercerait ainsi une grosse influence sur le sens de la catalyse, qui peut être inversée. L'étude de l'activité peroxydasique de H*b* a été entreprise par Max Jayle (92) : il a montré que H*b*, appartient au groupe des peroxydases thermostables et altérables à l'eau oxygénée ; si l'on fait réagir le système H^2O^2 + HI sur H*b*, il y a dégagement d'iode. Néanmoins, H*b* diffère des autres peroxydases en présence de glutathion, ou d'acide ascorbique. La vitesse de la réaction est proportionnelle au pouvoir réducteur de ces derniers composés, alors que les autres peroxydases ne sont pas influencés par eux.

Le dégagement d'iode est lent, régulier, et intégal en milieu réducteur ; en l'absence de réducteurs, il est brusque, puis ralentit et s'arrête à une position d'équilibre.

Dans l'organisme, H*b* n'est pas seul à réaliser l'oxydoréduction. G. Litarczek et G. T. Dinischiotu (87 *bis*), grâce à l'analyse spectrale, admettent que H*b* est lié dans le sang au glutathion, et qu'il doit ses propriétés d'oxydoréduction à l'anta-

gonisme entre le radical hémochromogène (le haem d'Anson et Mirsky) et le glutathion lié à la globine. Ils émettent l'hypothèse que c'est lorsque la fonction due au radical ferrugineux surpasse en intensité la fonction réductrice du groupe sulfuré que l'H*b* a de l'affinité pour l'oxygène ; il la perd lorsque l'influence du groupe — SH prédomine. De cette opposition d'influences résulterait l'affinité actuelle de l'hémoglobine.

A ce sujet, nous nous demandons si l'acide ascorbique, et en général les stérols contenus dans les hématies, ne jouent pas, dans ce mécanisme complexe, un rôle au moins aussi important ; voilà encore un problème que nous essayerons d'élucider.

En résumé, Lavoisier a vu juste ; H*b*O^2 est bien un oxyde ; il est labile vu son rôle d'autooxydateur, de transport et de fixateur d'oxygène ; le mécanisme de ces opérations est complexe, et revient surtout à l'atome fer ; comme s'exprime Max Jayle, on peut conclure que Hb « représente la fraction organométallique d'un système peroxydasique biologique ». Le fer représente ainsi le vrai catalyseur pour la respiration des tissus, il stimule d'autre part les organes chargés de l'hématopoïèse, et peut-être même ne serait il pas sans influence sur les facultés défensives des organes contre les syndromes pathologiques.

Chapitre II

Méthodes de dosage de l'hémoglobine

Généralités et Classification

Parmi les méthodes de dosage de l'hémoglobine, qui ont été publiées, il nous faut envisager :

1) Celles qui portent l'analyse sur la molécule d'hémoglobine elle-même.

2) Celles qui portent sur ses dérivés les plus immédiats, à l'exclusion de ceux qui pour leur obtention exigent une dégradation approfondie de leur molécule.

3) Celles qui portent sur l'un des éléments constitutifs de l'hémoglobine, soit le volume d'oxygène absorbable, soit le fer.

La première série de méthodes implique que H*b* pour son analyse ne doit pas subir de transformation chimique. L'idéal serait l'isolement des hématies et l'extraction de leur matière colorante à l'état de pureté, puis sa pesée. De telles méthodes n'existent encore pas. Des méthodes volumétriques ne peuvent être envisagées, vu qu'un réactif spécifique et l'indicateur de fin de réaction manquent encore ; nous ne pouvons retenir le procédé Quinquaud, d'intérêt historique. Ainsi, nous nions l'existence d'une méthode de référence permettant de doser l'hémoglobine en tant que H*b* ou H*b*O^2.

En revanche, nous connaissons de nombreuses techniques permettant l'analyse par l'estimation de quelques unes des propriétés physiques de l'H*b*. Il faut distinguer :

1) *Les méthodes chromométriques.*

Etude de la coloration propre de l'hémoglobine.

Méthode de Gowers 1878 (57)
Tallqvist (13)
Hayem (13)
Malassez (13)
Hallion et Borrien 1934 (64)

2) *Les méthodes spectroscopiques.*

Hénocque 1883 (60)
Williamson 1916 (130)

3) *Les méthodes photoélectrométriques.*

Kramer (83)

2. - Méthodes portant sur des dérivés de l'Hb

Les réactions chimiques de l'H*b* étant nombreuses, leurs combinaisons obtenues à l'aide de différents réactifs présentent des caractères propres plus faciles, d'après les chercheurs à déterminer que ceux de l'H*b*.

Nous distinguerons, suivant les réactions :

a) *Une méthode de dosage d'*H*b amenée à l'état de* H*b*CO

Palmer (101)

b) *Des méthodes de dosage d'hématine acide*

Sahli (19)
Autenrieth
Jacobson (75)
Hellige
Newcomer (96)

c) *Des méthodes à l'hématine alcaliné*

Cohen et Smith 1919 (37)

d) Méthode à la cyanhémoglobine

Stadie-Wu 1920 (32)

3. - Méthode mesurant le pouvoir peroxydasique de l'Hb

Méthode à la benzidine et eau oxygénée

Bing et Backer 1931 (30 et 133)

2. - Méthodes portant sur l'un des éléments constitutifs de l'hémoglobine

Comme les analyses basées sur les principes précédents ont toujours été tenues pour sujettes à caution, de précision clinique suffisante peut être pour un diagnostic, insuffisante néanmoins pour un travail de recherche, on a en général préféré des méthodes pouvant être classées comme méthodes de référence. On s'attache cette fois à apprécier la valeur exacte de l'un des éléments constitutifs de HbO^2 que cet élément fut labile ou stable. On a recouru soit aux dosages gazométriques, soit aux dosages ferrométriques.

a) Dosage de O^2 *dégagé par* HbO^2 :

Méthodes de Haldane 1899 (62)
Barcroft 1902 (25)
Nicloux 1914
Van Slyke 1928 (127)

b) Les méthodes ferrométriques.

Les auteurs se sont attachés surtout à estimer le fer sanguin total ; il s'agissait bien plus de connaître la teneur en Hb du sang, en dosant l'élément ferrugineux, que de savoir la proportion de ce métal dans une molécule. Ce dernier problème a fait l'objet de nombreux travaux, et nous l'avons exposé plus haut,

il est admis qu'il existe un atome de fer par molécule. Comme dans le sérum sanguin se trouve une proportion de fer non négligeable, on peut dire que les méthodes ferrométriques portent sur la totalité du fer, quelle qu'ait pu être la forme de ses combinaisons chimiques.

Depuis les mesures effectuées par Berzélius, Thénard et Prévost-Dumas, de nombreuses méthodes ferrométriques ont été préconisées.

Nous distinguerons des autres les méthodes de référence :

1) *Méthodes pondérales.*

Nicloux et Welter (99)

2) *Méthodes électrotitrimétriques.*

King et Howard 1927
Okac 1932 (100)

3) *Méthodes volumétriques.*

Fontes et Thivolle

Les autres par définition moins précises ne peuvent être considérées comme valables que si leurs résultats, sur des corps purs, coïncident avec les résultats obtenus par les méthodes précédentes. Ce qui y est déterminé est, soit l'ion ferreux, soit l'ion ferrique, soit un complexe obtenu à partir de ces ions. Lorsqu'on le détermine à l'état d'ion, il faut distinguer deux séries de techniques : les unes comporteront des liqueurs oxydantes pour doser le sel ferreux, les autres des liqueurs réductrices pour ramener le sel ferrique à l'état ferreux. Toutes les méthodes de dosage basées sur ce principe sont des méthodes volumétriques titrimétriques.

1. - Dosage du ferrosum

a) La liqueur oxydante est le $Cr^2O^7K^2$ en milieu acide.

Méthode de Penny (20)
— Knop, Rothé et Sotrinko 1920 (81)

b) La liqueur est MnO^4K en milieu acide.

Nous distinguerons la manganimétrie de la molybdomanganimétrie.

1) *Manganimétrie.*

Méthodes de Pelouze 1824
Margueritte 1902
Neumann 1902 (95)
Leclère 1902 (13)
Bertrand 1913 (3)
Scagliarini et Patresi 1929 (116)
Malkov 1931 (89)
Knop et Kubelkova 1931 (80)
Mme Mousseron 1932 (23)
Willner et Merck 1936 (130 *bis*)
Moreau (2)

2) *Molybdomanganimétrie.*

Fontès et Thivolle 1923 (55 *bis*)
Fleury et Marque 1920 (11)

c) La liqueur oxydante est du bromate mercusique.

Smith et Bliss (122)

2. - Dosage du ferricum

a) La liqueur réductrice est KI en milieu acide, et c'est l'iode libéré par le sel ferrique qui est dosé.

Méthodes iodométriques.

Mohr 1846 (20)
Henriquez 1927 (71)
Swift 1929 (124)
Filosoffovo et Melnick 1922 (49)
Rupp 1932 (114)
Henderson 1934 (68)
Lasausse 1934 (84)

b) Dosage du ferricum, amené à l'état de sulfocyanate, au moyen d'oxalates.

Méthode de Tarrugi et Silvatici

c) La liqueur réductrice est du chlorure titaneux.

Méthodes de Knecht et Hibbert
Klump 1934 (79 *bis*)
Mac Farlane 1938 (88)

d) La liqueur réductrice est du chlorure stanneux.

Méthode de Frèzénius (20)

e) La liqueur réductrice est de l'hyposulfite de soude.

Méthode de Malvezin (90)

Les méthodes ferrométriques, où le fer est dosé à l'état de complexe sont toutes colorimétriques.

Nous distinguerons les méthodes suivantes :

a) Le complexe est du $FeCl^3 2H^2O$, en milieu acide.

Méthode chlorhydrométrique de Denigès (6)

b) Le complexe est du bleu de Prusse.

Méthodes de Maquenne 1921 (91)
Ribereau et Gayon 1930 (108)
Reis et Chakmakjian 1931 (107)
Drilhon 1932 (42)

c) Le complexe est du sulfocyanure ferrique.

Méthodes de Lapicque 1897 (15)
Berman 1918 (29)
Jolles (4)
Brovn 1922 (32)
Newton-Kugelmass 1922 (98)
Wong 1923 (131)
Elvehjem 1931 (44)
K. Heise 1932 (20)

Méthodes de Scholz 1932 (118)
Winckler 1933 (129)
Butenschoen 1934 °
Szegoed et Cassoni 1934 (125)
Rakestraw 1936 (104)
Kuhlberg 1936 (83 *bis*)
Servantie 1937 (120)

d) Le complexe est du ferrithioglycolate d'ammonium.

Méthodes de Lyons 1927 (138)
Hanzal 1933 (65)
Burmeister 1934 (34)
Leavell et Ellis 1935 (86)

e) Le complexe est du ferrisulfosalicylate d'ammonium.

Méthodes de Lorbeer °°
Paviot, Chevallier et Revol 1928 (87)
Korenmann 1934 (82)
Rosanov 1935 (113)

f) Les complexes ne sont pas encore déterminés.

Méthodes de Zizine à l'alloxane 1925
à l'α-α'dipyridile : Blau 1898 (31)
Feigl 1931 (46)
Feigl-Krumholz 1934 (47)
Rosanov 1935 (113)
Mac Farlane 1936 (88)
l'α'dinitrophénol : Rosanov 1935 (113)
l'hématoxyline : Rivas-Goday 1933 (110)
l'hydroxyquinoleïne : Berg 1933 (28)
Stuckert 1935 (123)
Lavollay 1935 (85)
au cupferron : R. Paulais 1935 (102)

o. Butenschoen. — Voir : Dosage du fer dans le caillé, par S. Rauschning : Milchw. Forsch T. 16 p 459 — 1934.

oo. Lorbeer — Biochem. Ztg T. 181 p. 391 — 1927.

Chapitre III

Descriptions des méthodes utilisées

A. - Méthodes hémoglobinimétriques

Nous avons déjà distingué deux catégories de méthodes de dosage de l'H*b* (spectroscopiques et chromométriques ; parmi ces dernières, nous pourrons séparer celles où c'est l'œil qui est chargé d'apprécier les couleurs, et celles où c'est un appareil.

Nous avons dit qu'à priori, du fait de l'ignorance de la formule de l'hémoglobine et de celle d'un composé dérivé défini, que l'on peut doser d'une manière absolue, nous ne connaissons pas de méthode de référence.

Donc, le contrôle des méthodes hémoglobinimétriques a été exercé grâce à des méthodes portant sur des propriétés ou un constituant déterminé de la molécule ; un tel contrôle est-il justifié ? A notre avis, il le serait si la constitution de l'hémoglobine était constante, et ce fait, rien ne le permet de croire Interspécifiquement, nous savons que pour chaque espèce, l'hémoglobine du sang est d'une structure caractéristique et spécifique ; intraspécifiquement, elle subit des variations suivant le sexe et l'age ; les chiffres donnés pour la teneur en fer varient :

0,30% (Barral)
0,40% (Moreau)
0,34% (Ferville)

Ainsi, si 2 dosages sont discordants, l'un exécuté par hémoglobinimétrie, l'autre par ferrométrie, il ne sera pas permis de récuser l'un d'eux, car on n'est nullement d'accord sur la

teneur en fer, ni sur le coefficient à appliquer ; nous en concluons qu'on ne peut comparer la valeur d'une méthode chromométrique directe de Hb à une méthode de référence ferrométrique.

Est-il, en revanche, permis de les comparer aux procédés spectrométriques ?

Rappelons les appréciations de Ferville à ce sujet :

a) Les procédés spectrométriques, qui sont une analyse du sang total, non modifié, ne subissent pas la cause d'erreur due à l'imperfection de l'œil.

b) Ils ne sont maniables qu'après un entraînement.

Le meilleur procédé est celui de Williamson, qui perfectionna l'hématoscope de Hénocque, et repose, comme lui, sur le principe des 2 bandes égales ; on obtient avec du sang introduit dans une cuve, de telle sorte qu'il ait une épaisseur de 70 μ, un spectre de l'oxyhémoglobine, bien net par ses 2 bandes, égales en largeur et en intensité. Si l'épaisseur varie, ou si la concentration est différente, les deux bandes ne sont plus aperçues égales ; pour y revenir il faudra augmenter ou diminuer la concentration sanguine, et c'est d'après ces appréciations que s'effectue le dosage.

Est-ce là une bonne méthode de contrôle ? D'après les travaux de Bicart (4), on peut le nier ; les pigments du sang des anémiques ont des propriétés optiques anormales par rapport à ceux des pigments de sang normal, et les « coefficients d'extinction de l'oxyhémoglobine mesurés par les sommets des bandes α et β sont plus bas dans les sangs anémiques que dans les sangs normaux » (Forville) ; enfin le mode d'absorption est différé et de même les coefficients.

Il reste pour le contrôle, les méthodes gazométriques, mais à elles s'applique la même critique que pour les méthodes ferrométriques.

Mais, avant de rechercher une méthode de contrôle, examinons les méthodes chromométriques qui nous sont offertes.

A. - Procédés portant sur la coloration propre de l'hémoglobine

Les procédés devenus classiques, et de beaucoup encore les plus importants sont ceux de Tallqvist et de Gowers.

1°) Le procédé de Tallqvist consiste en la comparaison de la teinte obtenue par l'absorption d'une goutte de sang sur un papier buvard sur une échelle colorimétrique.

L'échelle-étalon comporte une série de rectangles teintés de la couleur de l'HbO^2 prise aux concentrations évaluées de 10 en 10%, de 10 à 100%, en considérant que cette dernière proportion correspond au sang normal, renfermant environ 15% d'HbO^2. Ces rectangles juxtaposés sont percés d'un trou central, au-dessous duquel on place le buvard teinté du sang que l'on veut analyser.

La méthode comporte donc, comme matériel, cette simple échelle colorimétrique ; le prélèvement de sang comporte quelques précautions : il y a lieu de s'assurer surtout que l'endroit où sera exécuté la piqûre soit exempt de sueur. La détermination devra être faite dès après le prélèvement ; le sang à l'air s'oxyde et prend une teinte brunâtre, qui ne sera plus celle de l'échelle ; elle comporte :

a) La préparation du papier buvard ; ce papier devra absorber lentement et régulièrement la goutte, afin que la teinte soit rendue homogène et uniforme.

b) La comparaison : on conseille de faire 2 comparaisons portant sur deux taches distantes l'une de l'autre de la distance de deux perforations de rectangles. Celles-ci ne peuvent être effectuées qu'à la lumière du jour ; enfin dit

la notice explicative : « la gamme et l'objet doivent être éclairés par la lumière réfléchie de leur surface, et non par une lumière transmise à travers leur texture ».

Hayem proposa un chromomètre consistant en une double cellule de verre calibrée.

L'un des côtés renferme du sang dilué, l'autre de l'eau distillée; sous cette cellule on fait passer une échelle colorée, et on compare les teintes.

Le fonctionnement de l'hémochromomètre de Malasset est ainsi décrit par Grimbert : « Il se compose d'un écran métallique percé de deux orifices ; derrière l'un on a un verre coloré reproduisant exactement la couleur d'une solution au 100e de sang contenant 5 % d'hémoglobine ; derrière l'autre orifice se trouve une cuve prismatique dans laquelle on place une dilution de sang au 100e (faite avec le mélangeur Potain). En arrière se trouve une glace dépolie ; en avant, on adapte un appareil optique à double réflexion totale permettant de comparer les images colorées fournies par la cuve et par l'étalon. Pour l'examen, on vise le ciel et on fait mouvoir la cuve jusqu'à ce que la solution sanguine reproduise exactement la teinte de l'étalon. Un index placé sur le côté de l'écran indique sur une échelle colorimétrique la quantité d'hémoglobine contenue dans 100 parties de sang. »

Dans la même catégorie, citons le procédé de Hallion et Borrien (64).

B. - Etude de la coloration due à un dérivé de l'hémoglobine

Palmer (101) propose une comparaison de la couleur de la carboxyhémoglobine (obtenue extempore en faisant barboter du gaz d'éclairage dans un volume donné de sang dilué) avec des étalons préparés à l'avance. Le procédé ne présente pas

d'avantages sensibles sur les autres, et a l'inconvénient de la toxicité des réactifs.

Voyons les méthodes à l'hématine acide dont les plus importantes sont celles de Sahli, Autenrieth et Newcomer.

Sahli traite l'oxyhémoglobine à l'aide d'acide chlorhydrique dilué; il obtient du chlorhydrate d'hématine de coloration brune dont il compare la teinte, à un étalon. Malgré les perfectionnements d'Autenrieth, la méthode reste inconstante et irrégulière. Berczeller a montré l'influence du plasma sur la coloration : si l'on dilue les globules de moutons dans des plasmas différents, les résultats divergent et donnent des erreurs de l'ordre de 10%. Wu a constaté que l'hémoglobine pure, traitée à égale concentration que dans le sang, soit 15 g. %, donne une coloration de 20% plus intense que le sang ; il y aurait donc influence inhibitrice partielle provoquée par les albumines ou les éléments salins du sang.

De plus, dans le sang, l'hémoglobine existe en suspension, et de la sorte l'intensité de la coloration est atténuée par des éléments altérant l'état de la dispersion. Enfin, Ferville (19) critiqua les résultats obtenus sur des sangs d'anémiques.

La méthode de Sahli fut perfectionnée par Autenrieth-Hellige.

On prélève 20 ^{mm3} de sang à l'aide d'une pipette spéciale ; on les traite par de l'acide chlorhydrique N/10 en complétant au volume de 2cc ; on mélange et on compare au colorimètre de Hellige. Les étalons en verre sont fournis avec l'appareil, et sont construits d'après les couleurs obtenues à l'aide de cristaux d'oxyhémoglobine pure extraite du sang humain et cristallisée selon la technique de W. Autenrieth et Dorner.

Cette méthode présente des avantages sur les précédentes :

a) La couleur est plus facile à apprécier.

b) Les résultats concordent mieux avec ceux donnés par le dosage ferrométrique.

c) Les étalons sont stables, et établis rationnellement.

Enfin, la méthode de Newcomer (96), basée sur le même principe a rallié de nombreux suffrages On prépare dans l'un des godets du colorimètre une solution d'acide chlorhydrique, dans laquelle on introduit un volume connu de sang ; on mèle ; dans l'autre on place une plaque de verre coloriée que l'on surmonte d'une colonne d'eau distillée : le verre sert de couleur étalon. Enfin, l'on compare les teintes.

Le procédé est plus simple et plus avantageux que les précédents, tout en donnant autant de garanties d'exactitude. C'est celui qui, d'après Servantie, donne les résultats s'approchant le plus de ceux donnés par la ferrométrie.

Passons aux méthodes à l'hématine alcaline ; la plus importante est celle de Cohen et Smith (37). On mèle un volume donné de sang à une solution à 10 % de HCl, à 37° — 40° environ pendant dix minutes ; on laisse réagir 35 à 40 minutes à la température du laboratoire. Puis l'on y mèle 5, 3 cc de solution au dixième d'hydroxyde de sodium. Par ailleurs on prépare une solution étalon, et l'on compare les teintes au colorimètre.

En comparaison des méthodes précédentes, cette dernière se révèle peu avantageuse, car elle comporte les inconvénients suivants :

a) Durée de la manipulation : (une heure), alors que pour la méthode de Tallqvist elle est instantanée, et que pour celle de Newcomer, elle ne dépasse pas 5 minutes.

b) La préparation d'une solution étalon, qui ne peut être conservée.

Sur le même principe est enfin bâtie la méthode de Stadie-Wu à la cyanhémoglobine, qui est considérée comme l'une des plus précises. On traite un volume déterminé de sang à l'aide d'une solution d'ammoniaque à 4 %, puis du ferricyanure de potassium ; on a ainsi obtenu de la méthhémoglobine ; par

KCN on le transforme en cyanhémoglobine. On prépare un étalon, et on compare.

Nous nous étendrons un peu plus sur la méthode de Bing et Baker basée sur la coloration provoquée par réaction de la benzidine en présence d'acide chlorhydrique.

Au moment de l'essayer, nous avons voulu nous rendre compte de la valeur possible de dosages de H*b* à l'aide de leurs réactions peroxydasiques. Nous avons utilisé la réaction à la teinture de gaïac, la réaction au pyramidon, et celle au réactif de Meyer ; nous avons été déçus dans nos recherches à la fois en raison de la fugacité des colorations apparues et de l'absence de proportionnalités entre leurs intensités et les concentrations. La plus satisfaisante à cet égard est la coloration violette très intense que donne avec $H\mathit{b}O^2$ le pyramidon en présence de H^2O^2 et de traces de pyridine ; elle est des plus sensibles, et il existe un parallélisme indéniable dans son intensité. Il y aurait lieu de rechercher là un stabilisateur de coloration qui confère aussi la proportionnalité à leur valeur.

B. - Méthodes ferrométriques

1. - Méthode manganimétrique de Bertrand

Principe : On réduit le fer sanguin, obtenu après calcination du sang, à l'aide de $Zn + HCl$, puis on titre le sel ferreux à l'aide de $Mn O^4K$.

1) *Réactifs nécessaires.*

1. Cristaux de NO^3NH^4.
2. SO^4H^2 pur concentré.
3. SO^4H^2 pur à 10 %.
4. Grenaille de zinc décapé, exempt de fer.
5. Solution de MnO^4K à 0,5 ‰, titrée au moyen d'alun de

fer ammoniacal : on dissout 8 g 60 de ce sel dans 1 litre d'eau acidulée d'acide sulfurique. On prélève 10cc que l'on traite par du Zn, filtre et titre.

2) *Mode opératoire.*

a) Calcination : dans une capsule de porcelaine tarée, on pèse 5 g de sang, évapore et incinère à l'aide de NO^3NH^4 ; on reprend les cendres par HCl concentré, puis par SO^4H^2 concentré jusqu'à dégagement de fumées blanches.

b) Dissolution : on traite les cendres sèches exemptes de HCl par SO^4H^2 à 10 %, on introduit dans un matras avec un gros grain de zinc et on munit d'un bouchon percé d'un tube effilé.

c) réduction : Zn réagit, et l'hydrogène dégagé réduit le sel ferrique en sel ferreux ; après 15 à 20 minutes, on décante et lave à l'aide d'eau bouillie.

d) Titrage : la liqueur ferreuse ainsi obtenue, et diluée à l'eau est titrée à l'aide de la solution MnO^4K à 0 g 5 par litre, jusqu'à apparition d'une légère coloration rose persistante.

2. - Méthodes de Fontès et Thivolle

1) *Réactifs nécessaires.*

1 Réactif phosphomolybdique.

Molybdate d'ammoniaque 40 g.

Soude pure à l'alcool 10 gr.

Eau distillée 100 cc.

Faire bouillir un quart d'heure pour chasser la majeure partie de l'ammoniaque. Refroidir par un peu d'eau et ajouter :

Acide phosphorique officinal très pur 200cc.

Carbonate de cuivre 0 g, 50.

Faire bouillir un quart d'heure. Compléter à un litre avec

de l'eau distillée. D'après les auteurs, le sel de cuivre agirait comme catalyseur, lors de la réduction par le fer et permettrait une réaction régulière.

2) Solution titrée de MnO^4K à 0 g, 08 par litre. La vérification du titre se fait grâce à une solution étalon de fer dont 10cc renferment 2 mg de fer à l'état ferreux.

2) *Mode opératoire.*

a) Méthode par précipitation directe du pigment.

b) Méthode par minéralisation du sang.

A. - Méthode par précipitation directe du pigment

Le pigment est isolé du sérum sanguin, et est précipité avec les matières albuminoïdes à l'aide d'une solution saturée d'acide picrique. Cette précipitation préalable a l'avantage d'éliminer de suite les éléments salins, les chlorures et les phosphates qui souvent empêchent un dosage correct ; mais, nous demandons-nous, des sels de fer se trouvant dans le sérum à l'état dissocié, ne sont-ils pas eux aussi éliminés par là même ? Nous avons tenté de rechercher la présence de fer dans le filtrat, mais en raison de la faible quantité qui pourrait s'y trouver, nous n'en avons pas décelé. Le coagulum, débarrassé de l'excédent d'acide picrique est lavé sur un filtre d'amiante, puis séché dans une petite nacelle en platine ou en porcelaine.

L'incinération a lieu au microfour de Pregl, constitué d'un tube en verre peu fusible, déposé sur un support en aluminium ; on chauffe le tout au bec Bunsen jusqu'à ce que la masse fût réduite en cendres. « La nacelle, disent les auteurs, introduite dans le four horizontal est chauffée modérément ; on peut alors pousser le feu et porter la nacelle au rouge sombre pour brûler tout le charbon restant ».

Pour réduire l'oxygène ainsi obtenu on introduit la nacelle dans un tube de verre dur, dont une extrémité est étirée en pointe capillaire, l'autre extrémité garnie d'un bouchon de

liège, percé d'un trou, admettant un tube capillaire par lequel arrive l'hydrogène pur et sec venant d'un appareil de Kipp.

Après avoir purgé d'air, on allume l'hydrogène à la pointe capillaire et on chauffe sous la nacelle. La réduction commence vers 400°, on voit l'oxyde noircir, puis s'affaisser, et au rouge sombre, le fer commence à s'agglomérer. A cet instant précis il faut cesser le chauffage. Après refroidissement, dans le courant d'hydrogène, la nacelle et son contenu sont introduits dans un tube à essai et agités avec 5 à 10cc de réactif molybdique phosphorique. Si la réduction a été bien conduite, la dissolution est presque instantanée à froid.

On titre le bleu de molybdène au permanganate. Il est prudent de s'assurer après décoloration, simplement par chauffage qu'il ne reste pas de petites particules de fer non dissoutes et donnant encore du bleu, ce qui arrive si l'on a trop chauffé le fer en le réduisant. Etant connu le nombre de centimètres cubes de permanganate employé, on détermine le titre en fer de cette même solution, par rapport à 10cc de la solution étalon.

B. - Méthode par minéralisation du sang

La minéralisation est une vraie kjeldahlisation ; dans un matras on introduit un volume de sang déterminé, et un même volume d'acide sulfurique pur concentré. (Bien entendu, de même que tous les autres réactifs, il doit être rigoureusement exempt de fer).

Au moment du chauffage, la masse noircit, et il se dégage des vapeurs blanches suffocantes, d'où nécessité d'opérer dans une hotte à bon tirage. Pour comburer la matière organique, on se sert d'acide azotique. Après un long chauffage, le fer est obtenu, en liqueur très acide, à l'état de sulfate ferrique.

Pour la suite du dosage, les auteurs s'inspirent du procédé de Ilinski et Knorre. La solution ferrique diluée par des eaux

de lavage est neutralisée à l'aide d'ammoniaque en présence de diméthylaminoazobenzol ; s'il s'est produit un début de précipitation, le précipité sera redissous par un léger excès d'acide sulfurique. On introduit le tout dans une ampoule renfermant déjà 5cc de solution de nitroso B naphtol à 4 % dans l'acide acétique cristallisable. Le précipité recueilli, et lavé suivant les précautions indiquées par les auteurs, est incinéré au micro-four, et l'oxyde de fer subsistant est réduit, comme précédemment par un courant d'hydrogène, puis dosé à la méthode molybdo manganimétrique.

Une autre technique, bien plus simple est proposée par les mêmes auteurs, lorsqu'on dispose d'un volume de sang supérieur à 2cc. La minéralisation au matras de Kjeldahl se fait suivant le même mode ; puis la liqueur claire et acide obtenue est alcalinisée par un excès de lessive de soude, en présence d'une solution saturée de sulfate de magnésie. Il se forme un précipité d'hydrate ferrique que l'on isole et filtre à la trompe sur un entonnoir de Buchner ; puis, après plusieurs lavages à l'eau distillée, on dissout le précipité à l'aide d'acide phosphorique à 40° B. La dissolution étant achevée, on réduit le phosphate ferrique en sel ferreux à l'aide de copeaux de cuivre décapés à l'acide nitrique. On filtre à nouveau pour séparer le sel ferreux de l'excès de cuivre, et le filtrat est reçu dans un tube ou un erlenmeyer dans lequel préalablement on a introduit 5cc de réactif phosphomolybdique.

3. - Méthode molybdo manganimétrique de Fleury et Marque

Nous avons vu que Fontès et Thivolle, après avoir amené le fer sanguin a l'état de sel ferreux, ne l'ont pas dosé directement avec MnO^4K. En raison de la sensibilité plus grande de la réaction, ils se servis comme intermédiaire du réactif phospho molybdique que le fer métallique, ou l'ionferreux réduisent:

$$2\,Fe + 3\,MoO^3 = Fe^2O^3 + 3\,MoO^2$$
$$2\,FeO + MoO^3 = 2\,Fe^2O^3 + MoO^2$$

L'oxyde bleu de molybdine est titré à l'aide de MnO^4K, qui le ramène au stade d'oxyde supérieur :

$$2\,MnO^4K + 5\,MoO^2 + 5\,PO^4H^3 = 2\,(PO^4H^2)\,Mn + PO^4K^2H + 5\,MoO^3 + 3\,H^2O$$

Nous ne trouvons pas de critiques à formuler à l'égard de la méthode, ou des méthodes de Fontès Thivolle, qui se sont révélées excellentes. Toutefois, y aurait moyen d'en simplifier la délicate technique ?

Fleury et Marque (11) y sont arrivés : on minéralise à l'aide de NO^3Mg, puis dissout les cendres dans HCl concentré ; le perchlorure obtenu est traité par du mercure ; on l'en sépare à l'état de solution ferreuse. Celle-ci réduit un volume donné de liqueur d'acide phosphomolybdique, que l'on titre au moyen d'une liqueur de MnO^4K N/400.

1) *Réactifs nécessaires.*

1. Solution concentrée à 50 % de NO^3Mg.

2 Acide chlorhydrique pur officinal.

3. Réactif phosphomolybdique de Fontès-Thivolle, que l'on prépare de la façon suivante :

Dans un ballon de 1 l, introduire :

Eau distillée	environ 300 cc.
Acide molybdique 20 g. (ou son sel d'ammoniaque 40 g).	
Soude pure à l'alcool	10 g.

Faire bouillir jusqu'au départ complet d'ammoniaque, ce qui demande au moins une demi-heure. Refroidir et ajouter :

Eau	300 à 400 cc.
Solution d'acide phosphorique obtenue avec 1 litre d'eau et 1 kg d'acide phosphorique cristallisé	200 cc.

Conservation indéfinie.

4. Mercure pur distillé.

5. Solution de MnO^4K N/400 préparée à partir de solutions mères N/10 ou N/100.

1cc sol MnO^4K $\frac{N}{400}$ correspond à 0,140 mg de fer.

2) *Technique opératoire.*

Elle consiste en une incinération, une dissolution des cendres, une réduction et un titrage.

La première opération est réalisée dans une capsule de platine, ou de porcelaine de diamètre de 60 à 70 m/m. On pèse 2 ou 3 cc de sang rendu incoagulable à l'aide de NaF ou de citrate de soude, et on mèle avec un demi cm^3 de solution de NO^3Mg ; on évapore avec prudence, afin d'éviter toutes projections et des pertes ; lorsque la masse est exempte d'humidité on la calcine au four à moufle, en ayant eu la précaution préalable de l'étaler en une couche homogène, jusqu'à ce que les cendres soient devenues à peu près blanches ; s'il subsiste des traces de charbon, d'après l'auteur, elles ne gênent pas les réactions.

La dissolution est pratiquée, après refroidissement des cendres ; on les arrose d'un cc de HCl ; la dissolution est rapide ; on agite bien puis on introduit dans un petit flacon de 15 cc à goulot étroit et muni d'un bouchon bien ajusté, en même temps que 10 cc d'eau de lavage.

La réduction est effectuée dans ce flacon à l'aide de 0cc, 3 de mercure ; on mèle très énergiquement la masse. Le perchlorure de fer réagit sur le mercure, transformé en calomel et, croyons nous, partiellement en un sous-oxyde noir, qui s'ajoute à du mercure émulsionné. La solution ferreuse est ainsi préparée ; on la filtre sur un filtre d'amiante sur 10cc de liqueur phosphomolybdique.

Le dosage a lieu par affusion graduelle et régulière de gouttes de liqueur N/400 de MnO^4K, contenu dans une burette de 20 ou 25 cc, jusqu'à décoloration.

La correction est d'environ 0cc 2 ou 0, 3cc.

Soit : p le titre de la solution de MnO^4K (*Fe* en mg par cc) ;
n le nombre de ce corrigé ;
P la prise de sang exprimée en grammes ;
Fe (en mg pour 1000 g de sang) $= \frac{n \cdot p \cdot 1000}{P}$.

4. - Méthode iodométrique de Lasausse et L. Frograin

On calcine le fer sanguin et l'amène au stade de Fe^2Cl^6 celui-ci en présence de KI libère l'iode que l'on titre à l'aide d'une solution N/200 de $S^2O^3Na^2$. La méthode comporte une minéralisation et un dosage. La première est effectuée en traitant 5 cc de sang laqué par 0,5 de NH^3, par 1 cc de suspension aqueuse à 10 % de *MgO* et on mèle au fil de platine On évapore doucement et on calcine au four à moufle. Les cendres sont traitées à plusieurs reprises par *HCl* ; enfin, la dissolution achevée, on dilue à l'eau au volume de 100 cc. Le dosage consiste en l'addition de 10 cc de solution de KI à 10 %, et la mesure par titrimétrie à l'aide de $S^2O^3No^2$ N/200, de l'iode dégagé ; 1 cc de liqueur correspond à 0 mg, 279 de fer ; le terme de la réaction doit être observé en présence d'empois d'amidon à 1 %. Un essai à blanc d'un témoin, doit accompagner l'analyse.

Méthodes colorimétriques

5. - Méthode chlorhydrométrique de Denigès

« Elle repose sur la production d'une coloration jaune intense due à la formation d'un acide chloroferrique Cl^5 FeH^2 ou $FeCl^3$, $2H2o$, lorsque le fer III est amené en solution chlorhydrique concentrée, coloration proportionnelle à la quantité de fer III mise en œuvre.

Technique : Dans une petite capsule de platine, de quartz

ou même de porcelaine, on introduit 0 cc 5 de sang ; on évapore à sec, sur un carton d'amiante, puis on calcine jusqu'à disparition complète de fumées. On laisse refroidir et on ajoute au résidu, toujours un peu noir et charbonneux, 5 à 6 gouttes d'une solution saturée à froid, de nitrate d'ammonium. On évapore et calcine de nouveau, et on répète cette opération deux ou trois fois jusqu'à combustion complète du charbon et obtention d'un résidu jaune rougeâtre d'oxyde ferrique qu'on dissout — en s'aidant au besoin d'une légère chaleur — dans 4 cc HCl pur concentré. La solution étant complète, on introduit le liquide jaune dans un tube à essai (de 16 m/m de diamètre sur 16 % de longueur) portant un trait de jauge à 5 cc et on complète ce volume, jusqu'au trait, avec de l'acide chlorhydrique pur y compris les quelques gouttes de cet acide qui auront servi à laver la capsule.

Dans un tube semblable, on introduit 5 cc du même acide chlorhydrique et, à l'aide d'un compte-gouttes calibré à g gouttes par cm³, — on y verse, goutte à goutte, en agitant, et jusqu'à coloration jaune à peu près identique dans les deux tubes, une solution de Cl^3Fe liquide officinal (qui est à 112g de fer III par litre, soit 112 mg^2 par centimètre cube) diluée de telle façon que chaque goutte de liquide corresponde à $0mg^2$ 02 de fer, ce qui représente une dilution de

$$\frac{112}{g \cdot 0.02} = \frac{11.200}{2g} = \frac{5600}{g}$$

Lorsqu'on sera arrivé à une coloration presque aussi intense dans le second tube que dans le premier, on notera le nombre a de gouttes employées pour atteindre ce résultat, on mettra a gouttes d'eau dans le premier tube et dans le second, on continuera d'ajouter avec précaution des gouttes de Cl^3Fe dilué, afin d'arriver à une coloration jaune identique dans les deux tubes. Soit a' le nombre de gouttes ainsi dépensées ; en général une à trois gouttes doivent suffire pour arriver à ce résultat. La dose totale de Cl_3Fe dilué sera donc :

$$a + a' = A.$$

La quantité de fer correspondante α sera par suite :

$\alpha = A \cdot 0.02$ par demi cm^3 de sang ;

soit 4 A*mg* pour 100 cc de sang.

6. - Méthode du ferrocyanure de Drilhon

Le fer sanguin est extrait par minéralisation au mélange nitroperchlorique ; les cendres sont dissoutes à l'aide de HCl, et la solution de perchlorure est traitée par une goutte de solution de ferrocyanure à 1 %. On compare la liqueur à une gamme étalon de solution de concentration croissante de bleu de méthylène, ou l'on effectue la comparaison au colorimètre de Dubosq.

7. - Méthode de San-Yin-Wong

Ce procédé nécessite les réactifs suivants :

1 Une solution de ClO^3K à 10 %.

2 De l'acide sulfurique dépourvu de fer.

3 Une solution de SCNK à 292 g °/₀₀ ou $SCN{-}NH^4$ à 228 g au litre (titre égale 3 N).

4. Un étalon de liqueur de fer à 0 g 10 par litre.

Technique : *a*) Extraction du fer sanguin : 1 cc de sang, dilué à l'aide de 4 cc d'eau distillée est traité par un cc de So^4H^2, à chaud ; après refroidissement on ajoute 1 cc de solution de ClO^3K, et reporte à l'ébullition, jusqu'à émission de vapeurs blanches. On refroidit et complète dans un tube à essais gradué, au volume de 16 cc.

b) *Dosage :* On prépare la couleur témoin en traitant 1 cc de solution étalon, acidulée de 1 cc SO^4H^2 et diluée à 16 cc. Puis, les deux tubes étant prêts, on les porte dans un thermostat pour réaliser une égale température de laboratoire. On introduit ensuite dans chacun d'eux 5 cc de solution de sulfocyanates et complète à 25 cc. On compare les teintes obtenues au colorimètre de Dubosq.

Servantie améliora cette technique délicate pour ce qui concerne l'extraction de la façon suivante :

A. Réactifs nécessaires.

a) Acide sulfurique pur concentré.

b) Un solution à 10 % de tungstate de soude.

c) Une solution saturée de persulfate de potassium, à préparer dans un flacon bouché à l'émeri.

d) Une solution 3N de sulfocyanate de potassium (146 g dans 500 cc d'eau distillée ; filtrer et ajouter 20 cc d'acétone.

e) Une solution étalon de fer à 0,10 °/₀₀.

Mode opératoire : On traite dans un ballon 0,5 cc ou de préférence 0 g 50 de sang par 2 cc d'acide sulfurique, en agitant fortement, puis 2 cc de solution de persulfate. On place au bain-marie à 80° dix minutes durant et l'on refroidit ; on dilue à l'aide de 25 cc d'eau auxquels on adjoint 2 cc de solution de tungstate de soude On complète à 50 cc, on agite et filtre. 20 cc de filtrat sont prélevés pour l'analyse, dans un tube à essais.

Le témoin est préparé à son tour, dans un tube semblable :

1 cc de solution à 1 g par litre de fer.

0.8 cc d'acide sulfurique.

18.2 cc d'eau distillée.

Puis, à chacun des deux tubes, on ajoute :

1 cc de solution de persulfate.

4 cc de solution de SCNK.

Une coloration rouge intense se développe, que l'on détermine au colorimètre de Dubosq.

8. - Méthode à l'acide thioglycolique de Leavell et Ellis

On détruit la matière organique par le mélange sulfoperchlorique, on neutralise l'acidité de la liqueur ferrique extraite

à l'aide d'ammoniaque ; puis l'on acidule légèrement avec SO^4H^2 dilué. Puis l'on traite la liqueur amenée à un volume déterminé (10 cc) par un volume fixe d'une solution à 8 % d'acide thioglycolique dans NH^3 à 16 %, il se dégage une coloration pourpre caractéristique ; on exécute la même réaction sur une solution étalon de sel ferrique à 0 g 10 °/₀₀ et l'on compare au colorimètre de Dubosq.

9. - Méthode à l'acide sulfosalicylique de Korenmann

On prépare des tubes à essai gradués à 5 cc. On minéralise le fer sanguin selon les méthodes classiques (mélange sulfonitrique, ou sulfoperchlorique) ; on dissout les cendres dans de l'eau chlorhydrique, de façon à ne pas dépasser le volume de 3 cc ; on introduit le tout dans un tube à essai, et avec les eaux de lavage, on complète à 5 cc. On prépare une solution étalon avec :

25 *mg* de sel de Mohr.

2,5 g acide sulfosalicylique.

75 cc NH^3 à 10 %. — On complète à 250 cc.

Le tube à essai resté incolore sera additionné de :

0,5 cc de solution à 10 % d'acide sulfosalicylique.

1,5 cc de NH^3 à 10 %.

Il apparaît une coloration jaune que l'on compare au colorimètre à la couleur de la liqueur type.

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

Chapitre Premier

1. - Problème de la méthode de référence

Ainsi, comme l'a démontré notre classification, les méthodes biochimiques de dosage de l'hémoglobine se révèlent très nombreuses et très variées. Nous n'avons pas l'intention de les décrire toutes, préférant renvoyer à leur texte original.

Le nombre de ces méthodes est une preuve de l'intérêt attaché à l'hémoglobinimétrie et à la ferrométrie, et il est certain qu'à la suite des progrès de la chimie analytique, il s'élèvera encore ; il répond à un besoin immédiat et urgent ; pour faciliter le diagnostic rapide des diverses catégories d'anémies, il est même, dans les cas graves, nécessaire de connaître à la fois le taux en H*b* et le taux en fer du sang, vu que les traitements différeront totalement d'après les résultats des deux sortes d'analyses. Un embarras compréhensible peut se produire si un tel choix de méthodes se présente ; voilà pourquoi nous allons les discuter.

Mais sur quelle base, d'après quels principes pourrons-nous les juger ? La plupart du temps les chercheurs se sont contentés, le jour où ils ont découvert et mis au point une méthode, de la comparer par ses résultats à une autre méthode considérée exacte, précise, classique. Aurons-nous le droit d'agir de même, en rassemblant simplement les résultats don-

nés par les diverses méthodes, les résultats discordants nous amenant de facto à rejeter la méthode ?

Les méthodes hémoglobinimétriques ont été comparées à celle de Gowers, puis à celle de Newcomer. Comment se fait-il que parfois même certains soient allés jusqu'à dire que leur méthode à eux est meilleure, alors qu'elle donne tout simplement des résultats plus élevés que les méthodes dites classiques ? En ce qui concerne la ferrométrie, il était d'usage de comparer la nouvelle méthode à celle de Lapicque, de Bertrand ou de Fontès-Thivolle ; le procédé pratiquement est mieux défendable, puisque les méthodes prises comme modèles sont excellentes Mais, a priori, est-ce admissible, suffit-il qu'une méthode soit consacrée pour qu'elle devienne un procédé de référence ? Le raisonnement nous interdit de l'admettre et pour notre part, nous nous refusons à prendre une méthode comme procédé de référence, parce qu'elle a donné jusqu'à présent satisfaction à la plupart des chercheurs. Nous posons le postulat :

Un procédé de référence doit comporter, au degré maximum de sensibilité, une analyse exempte d'erreurs d'un corps pur, de constitution bien définie, de formule connue.

Existe t-il de tels procédés dans notre liste ? Nous avons déjà exposé que la totalité de l'hémoglobine ne peut être isolée, séparée des autres éléments d'un volume connu de son milieu, et déterminée.

On n'a encore pu la recueillir à l'état pur, trouver un réactif qui donne avec ce composé une réaction totale quantitative, irréversible et caractéristique ; si on isole l'hémoglobine, on ne sait jamais si elle n'a pas subi l'hydrolyse partielle, si une partie de la globine ne s'est pas détachée de la molécule ; enfin, la formule entrevue n'est pas encore connue, donc, a priori, même si pratiquement elle donne satisfaction, il nous est interdit de tenir aucune méthode hémoglobinimétrique pour procédé de référence.

Il nous reste à discuter des méthodes ferrométriques ; tant que nous n'avons pas trouvé une constance absolue de teneur en fer de l'hémoglobine, nous nous refuserons à déterminer l'hémoglobine en multipliant le chiffre du fer par un coefficient ; c'est pourquoi il ne serait question ici que du fer sanguin. Parmi ces méthodes, lesquelles préconisent l'isolement du fer à l'état pur ? Nous ne connaissons que les méthodes pondérales, électrométriques et la microméthode de Nicloux. Nous allons voir si rationnellement nous pouvons les proposer en modèle.

1. - Les méthodes pondérales

Les méthodes pondérales ont été les premières utilisées ; les premiers auteurs qui voulurent doser le fer (Le Canu, Prévost, Dumas et Berzélius) (36) calcinèrent les cendres et en pesèrent le fer préalablement isolé a l'état d'oxyde Fe^2O^3. Il ne nous a pas été possible de reprendre leur procédé, rationnel, de valeur chimique et théorique incontestable, car ce n'est pas un procédé biochimique ; il comporte un prélèvement de sang d'au moins 100 g Aussi, ne nous y arrêtons-nous pas. Nicloux et Welter (99) proposèrent en 1921 un procédé de microdosage pondéral. Le matériel essentiel consiste en une microbalance de Kuhlmann, sensible au millième de milligramme pour une force de 20 g. La matière organique est incinérée, et le fer isolé à l'état pur, oxydé à l'aide de l'acide nitrique. Au rouge sombre il ne reste que du Fe^2O^3 que l'on pèse ; puis on le réduit au rouge sombre ; il reste alors du fer métallique que l'on pèse ; de la quantité d'oxygène détachée de l'oxyde ferrique on déduit la proportion de fer présente. Les auteurs trouvèrent des erreurs de dosage au sujet du fer sanguin, car lors de la réduction, il s'échappe du *NaCl* volatil à haute température. Ne disposant pas d'une balance d'une telle sensibilité, il ne nous a pas été possible de chercher à lever la difficulté qui s'oppose au dosage proposé par Nicloux et Welter.

Deux autres méthodes pondérales ont été proposées ; elles reposent sur le principe de la combinaison du fer avec le nitroso β naphtol.

Une particularité bien connue du fer est son aptitude à se combiner à de nombreux composés organiques, et à s'y engager dans des complexes où il se trouve par la suite dissimulé.

Il existe un procédé pondéral de Moreau.

Les différents chercheurs sont satisfaits de ce procédé quoique B. Moreau, A. Morel et C. Gauthier y aient relevé des erreurs allant jusqu'à 10 %, lorsqu'on opère sur un cc de sang ; si au contraire, on utilise des quantités de l'ordre de 10 g, l'erreur a été trouvée minime, inférieure à 1 %. A ce titre, le procédé Moreau pourrait être un procédé de référence ; cependant, la nature du complexe nous est restée obscure ; combien faut-il de molécules de nitrosonaphtol pour un atome de fer ? et surtout sait-on ce que l'on pèse ? Pour ces dernières raisons, et non point pour l'imperfection de la technique, nous sommes amenés à rejeter cette méthode comme procédé de référence.

La précipitation des sels ferriques par le nitroso β naphtol étant sélective (car les autres métaux, même les voisins les plus immédiats du fer dans la classification de Mendéleef ne sont pas touchés), d'autres auteurs proposèrent la même réaction de précipitation (on croit qu'il se forme du ferrinitroso β naphthol ($C^{10}H^6ONO)^6Fe^2$) puis après séparation, sa calcination et la pesée à l'état de Fe^2O^3. A l'heure actuelle, ce procédé nous semble encore plus rationnel que le précédent, toutefois il exige le même appareillage délicat que la méthode de Nicloux et pour cette raison encore, nous ne l'avons pas essayée.

2. - Méthodes électrométriques

Dans la littérature, il est fait une place bien restreinte aux méthodes de dosages électrométriques ; la plus importante d'entre elles est la méthode d'Okac ; celle-ci comportant un

appareillage très complexe, nous n'avons pu l'étudier ; comme d'autre part il est connu que le transport de l'ion de fer sur la cathode se fait moins facilement et moins régulièrement que pour la plupart des autres métaux, nous ne sommes pas certains de la précision de ces méthodes et ne les admettons pas comme procédés de référence.

3. - Méthode volumétrique de Fontès et Thivolle

Nous en venons à considérer la méthode de G. Fontès et Thivolle, qui est volumétrique.

En principe, elle consiste en un isolement, à l'état pur, du fer, engagé comme précédemment dans la combinaison nitroso β naphtolique ; ce complexe, débarrassé de toutes impuretés minérales et calcinées, et l'oxyde de fer Fe^2O^3 obtenu est réduit par l'hydrogène à l'état de fer métallique ; on le dissout dans du réactif molybdique. Celui-ci incolore au stade d'oxydation correspondant à l'oxyde MoO^3 , se colore en bleu intense du fait de sa réduction :

$$2Fe + 3MoO^3 = Fe^2O^3 + 3MoO^2$$

L'oxyde MoO^2 est dosé par une solution titrée de MnO^4K qui le ramène à son stade d'oxydation primitif.

S'agit-il là d'un procédé de référence ? Nous pouvons répondre par l'affirmative, car nous déterminons ici un composé bien séparé de tous les autres éléments qui pourraient gêner la réaction ; il s'agit d'un corps qui a été isolé à l'état pur, et dont la formule et la constitution sont bien définies. Une seule difficulté subsiste cependant : il s'agit de savoir si au cours de la réduction, le fer se trouve bien complètement réduit à l'état métallique, ou s'il reste des traces d'oxyde FeO.

Celle-ci seule pourrait porter atteinte à l'admission de cette méthode en tant que procédé de référence, car là tout le

fer et rien que le fer y est dosé. Donc cette réduction ramène-t-elle tout l'oxyde de fer à l'état minéral ? La chimie nous enseigne que le corps intermédiaire entre le fer et le sesquioxyde, le protoxyde, n'est pas stable à la température ordinaire, car il se décompose au dessous de 570°; lorsqu'on réduit Fe^2O^3, il se forme toujours ce protoxyde FeO ; mais ce dernier est parfaitement réduit à température plus basse, par l'hydrogène.

La difficulté posée par la réduction de Fe^2O^3 nous semble levée de 2 manières :

a) Ou bien, on opère la réduction lentement, en ayant soin de rester au-dessous de 570°.

b, Ou bien, tout le sesquioxyde ayant été rapidement réduit à haute température, il faudra continuer assez longtemps le dégagement d'hydrogène aux environs de 500°.

On a donc isolé du fer pur, et sa constitution est bien définie, et en définitive, de même que la méthode de Nicloux et Welter, nous consacrerons la microméthode de Fontes et Thivolle comme procédé de référence.

En ce qui concerne la méthode par précipitation directe du pigment, nous serons d'un avis différent, car il existe du fer à l'état de traces dans le sérum, et quoique, vu les minimes proportions, nous ne l'ayons pas décelé, il n'est pas encore permis de nier sa présence, et ce fer échappe à l'analyse

Quant à la dernière méthode, théoriquement elle est admissible, mais comme les auteurs eux même préfèrent les deux autres techniques pour des prélèvements faibles, il s'ensuit que cette dernière méthode, moins sensible, ne doit pas être admise au même rang que les autres.

Le résultat de notre sélection est le choix de 2 procédés de référence : la méthode de Nicloux et Welter, et la microméthode par minéralisation de Fontès et Thivolle à l'exclusion de toutes les autres. Ces dernières seront comparées aux premières, et comme nous ne disposons pas de balance extra-sensible, nous comparerons à la méthode Fontès et Thivolle seule.

Chapitre II

Comparaison et critique technique des méthodes de dosage ferrométriques

Lors du choix de la méthode de référence, nous avons été amenés une fois de plus à séparer les méthodes ferrométriques des méthodes hémoglobinimétriques. La logique eut voulu, puisque c'est l'hémoglobine que nous voulons déterminer, que nous passions d'abord en revue les secondes ; mais comme parmi ces dernières nous n'avons pas trouvé de procédé de référence, leur étude ne nous semble rationnelle qu'à la suite de l'étude des méthodes ferrométriques.

En pratique, les méthodes sont en général peu usitées, vu leur complexité, la longueur et la délicatesse des manipulations ; dans la plupart des cas, la préférence est allée aux méthodes hydrovolumétriques, soit titrimétriques, soit colorimétriques.

A. - Méthodes Titrimétriques

L'ion fer se prête bien aux dosages titrimétriques, en raison de sa possibilité de se trouver en solution à deux stades d'oxydation différents ; comme le passage de l'un à l'autre est immédiat et quantitatif, la teneur en métal sera déterminée par la consommation de la liqueur oxydante ou réductrice. Les auteurs préfèrent le dosage du sel ferreux, sans doute, croyons-nous, en raison de l'affinité plus grande manifestée pour les liqueurs oxydantes et surtout, du moins d'après nos recherches, de l'appréciation bien plus facile de la fin de réaction. Nous étudierons donc d'abord le dosage du fer sanguin à l'état ferreux. Voyons d'abord ce qui nous a semblé digne d'intérêt ou passible de critique dans le mode opératoire des méthodes manganimétriques.

La première en date est celle de Pelouze, améliorée par Margueritte ; celle-ci ne peut convenir directement au dosage du fer sanguin, à moins que $NaCl$ et les autres électrolytes n'aient été intégralement éliminés Le procédé de Neumann (1902) est une adaptation de la méthode de Margueritte. En principe le permanganate transforme le sel ferreux en sel ferrique du fait de la réaction suivante :

$$2MnO^4K + 10SO^4Fe + 8So^4H^2 = So^4K^2 + 2So^4Mn + 5(So^4)^3Fe^2 + 8H^2O$$

1 cc. de permanganate de potassium décinormal à 3 gr. 16 par litre correspond à 0 gr. 005585.

Donc, on prépare à partir du fer sanguin une liqueur ferreuse, et on titre à la liqueur de MnO^4K. L'agent réducteur est de l'hydrogène sulfuré, le gaz sulfureux, le zinc ou le chlorure stanneux. Tous ces produits doivent être très purs, et quant à nous, nous préférons, comme Fleury et Marque, l'usage du mercure, qui ne forme pas d'amalgame avec le fer, et qui livré à l'état pur, ne renferme jamais de traces de fer. La liqueur ferreuse est titrée en milieu sulfurique à l'aide d'une liqueur N/10 de $MnOK^4$, jusqu'à apparition d'une coloration rose, due à l'excédent du réactif, indiquant par là même la fin de réaction. Le procédé Neumann manque de sensibilité, et dans notre essai de la méthode, nous n'avons pu l'appliquer aux prélèvements de petit volume ; de même que le procédé de Pelouze, ce n'est pas une micro méthode.

Nous retiendrons du procédé de Bertrand les avantages suivants :

a) pour la minéralisation, l'auteur préconise l'addition de nitrate d'ammonium ; ce sel a le gros avantage d'être éliminé de son milieu par le chauffage lui-même ; pour cette raison, il nous semble préférable au nitrate de magnésium.

b) l'auteur élimine les chlorures, qui gênaient et faussaient la détermination, à la suite de l'action du permanganate libérant le chlore.

c) la facilité de la détermination et de l'appréciation de la fin de réaction.

Cependant un inconvénient à notre avis subsiste : l'usage du zinc comme réduteur : d'une part, il subsiste le risque de la présence de traces de fer, et d'autre part le dégagement d'hydrogène qui n'est pas catalysé par les sels de fer, avec des réactifs rigoureusement purs s'amorce de façon irrégulière. Cette difficulté nous semble facilement levée en utilisant ici encore le mercure.

D'autre part la technique de la minéralisation dans une capsule de porcelaine nous a paru très délicate ; il est réellement difficile d'empêcher, lorsqu'on se sert de 5 gr. de sang, des projections de matière brûlée Dans ces conditions nous proposons 2 modifications à la méthode de Bertrand.

a) on introduit dans un matras Kjeldahl 3 à 5 gr. de sang préalablement pesés ; on détruit la matière organique grâce à un mélange d'acide sulfurique et d'acide azotique ; le liquide clair obtenu est versé dans une capsule de porcelaine, évaporé à sec.

b) le fer minéralisé, dissous dans de l'acide chlorhydrique à 10% est versé dans un flacon bien bouché renfermant 1 à 2 cc. environ de mercure ; on agite très fortement durant quelques minutes, on laisse reposer 20 minutes environ, et l'on filtre. La suite de la technique n'est pas modifiée.

C. Scagliarini et P. Patresi (116), en 1929, proposèrent une méthode rapide, qui diffère de la méthode dè Neumann par le choix de l'agent réducteur ; les auteurs proposent le cuivre. Les sels ferriques obtenus à la suite de la minéralisation sont dissous dans de l'acide sulfurique ; on introduit du cuivre bien décapé et pur, en milieu fortement acide et à chaud.

$$(So^4)^3Fe^2 + Cu = So^4Cu + {}^2So^4Fe$$

So^4Fe est titré suivant la technique manganimétrique, après séparation de l'excès de Cu.

Nous avons étudié cette modification, et ne voyons aucun inconvénient à l'usage du cuivre, plus avantageux que le zinc. Cependant nous préférons le mercure qui a le gros avantage de réduire à froid aussi bien qu'à chaud, et dont le produit d'oxydation sera séparé de la solution ferreuse et ne gênera en rien la suite des réactions, alors que le So^4Cu est impossible à éliminer.

Malkov (89) se servit comme réducteur de Cu^2O et préconisa une méthode analogue à la précédente.

Knop et Kubelkova (80) proposèrent (1931) à la réaction manganimétrique un indicateur de fin de réaction, destiné à en faciliter l'appréciation.

Le fer sanguin minéralisé est dissous dans HCl ou So^4H^2, et amené à l'état ferreux ; on ajoute ensuite So^4Mn (2 cc. de solution à 10%).

Nous nous sommes servis largement de la méthode de Fleury-Marque qui nous parait aussi satisfaisante que la méthode de Fontès-Thivolle ; aussi sommes-nous très surpris de la voir critiquée. Ferville (9) lui préfère la méthode de Wong, surtout en raison de sa facilité, et conclut en disant que « la méthode de Fleury et Marque ne semble pas répondre aux conditions cliniques ». La critique nous apparait aussi injuste qu'obscure, et nous la rejetons. Sans doute la précision de la méthode de Fontès-Thivolle est elle supérieure par sa sensibilité ; mais une excellente méthode titrimétrique sera pour nous toujours préférée à une méthode colorimétrique, élégante certes, mais de valeur non absolue, et sujette au jugement de l'œil, organe imparfait

Les avantages de la méthode de Fleury et Marque tiennent :

a) à son extrême sensibilité ; la prise de sang est faible, et la liqueur de MnO^4K très diluée ;

b) la minéralisation est plus facile que dans les méthodes

précédentes. Toutefois, au NO^3Mg nous préférons substituer du NO^3NH^4, oxydant qui s'échappe lors de la combustion et ne gêne plus les déterminations ultérieures ;

c) le choix du mercure comme agent réducteur ;

d) la précision de ces résultats.

Nous n'y trouvons pas d'inconvénients ; sans doute est elle délicate, mais pour cette raison même, elle convient parfaitement à la recherche théorique, et quoiqu'on dise, nous prétendrons qu'elle convient fort bien aux dosages ferrométriques en chimie médicale.

Méthode de dosage du ferricum

La réduction du sel ferrique obtenue à la suite de la combustion peut sembler superflue si l'on arrive à l'obtenir en dissolution en l'absence de tout autre élément oxydant. La précaution de la réduction est-elle inutile? Et les méthodes de dosage du ferricum seront-elles de même valeur que les précédentes ?

Le dosage par la mesure de la quantité d'iode libéré de HI par action d'un sel ferrique a déjà été préconisé par Mohr en 1846 (94).

Son principe est basé sur la réaction :

$$Fe^2Cl^6 + 2HI \rightarrow 2HCl + I^2 + 2FeCl^2$$

La réaction est réversible, et est régie par la loi d'action des masses ; aussi est il indispensable de fixer les conditions dans lesquelles il faut opérer.

Swift (124) adapta la méthode de Mohr à la biochimie. Le fer sanguin obtenu après minéralisation est mis en présence de $KI + HCl$ et l'iode dégagé est titré à l'aide d'une solution de $S^2O^3Na^2$; l'auteur a déterminé les masses à mettre en présence, avec leurs concentrations exactes respectives, en vase clos, à

l'air libre, et en atmosphère de CO^2. Dans ce dernier cas les résultats sont moins élevés, et l'auteur admet que si à l'air libre, les résultats sont exacts, malgré que la réaction fut inachevée, c'est dû à une erreur par excès de compensation provoquée par l'oxydation causée par l'air ambiant ; les résultats diffèrent suivant l'acide employé.

La méthode iodométrique la plus importante est sans conteste celle de Lasausse et L. Frograin (84) qui ont perfectionné celle de Henderson.

Lasausse et Frograin ont réalisé les conditions expérimentales optima ; le dégagement d'iode est total. Bien que la méthode reste délicate, il n'est pas permis de s'écarter des conditions de l'équilibre posées.

Pratiquement, en opérant avec rigueur de la même manière que les auteurs, la méthode de Lasausse nous a donné des résultats corrects ; en atmosphère d'azote, nous avons obtenu des chiffres moins élevés ; l'oxygène de l'air contribue donc pour une part à corriger les résultats. L'inconvénient de cette méthode réside surtout dans la réversibilité de la réaction.

Reprenons l'équation de Mohr :

$$Fe^2Cl^6 + 2HI \rightleftharpoons 2FeCl^2 + 2HCl + I^2$$

Transcrivons avec la notation ionique :

$$Fe^{+++} + 2HI \rightleftharpoons Fe^{++} + H^+ + I$$

D'après la loi d'action des masses :

$$\frac{[Fe^{++}]\,[H^+]\,[I]}{[Fe^{+++}]\,[HI]} = K$$

En solution concentrée, il y a réaction dans le sens de dégagement d'iode ; en solution diluée, c'est l'inverse qui se produit ; il nous faudra donc éviter les dilutions.

Pour que la réaction fût irréversible, il faudrait que l'iode ainsi libéré fût éliminé de son milieu ; lorsqu'une portion d'iode est enlevée aux masses réagissantes, le système évoluera dans le sens d'une consommation nouvelle d'ions ferriques et de HI en vu de rétablir l'équilibre. L'idéal serait de pouvoir distiller l'iode dégagé et de le recueillir ultérieurement pour le dosage. et encore faudrait-il que cette distillation fût effectuée à froid et dans le vide.

Nous n'avons donc pu lever de cette manière la difficulté de la réversibilité de la réaction.

Nous avons d'abord pensé engager l'iode libéré dans une combinaison organique insoluble ; un composé tel que l'antipyrine serait introduit dans le même milieu, et absorberait quantitativement l'iode dégagé ; nous n'avons pu avoir satisfaction de cette manière de procéder, car une foule de composés organiques se combine aussi aux sels de fer

Puis, nous avons pensé éliminer l'iode par la soustraction à son milieu à l'aide d'un liquide non miscible à l'eau. Le benzène, le sulfure de carbone, le tétrachlorure, et le chloroforme ont été essayés, et le sulfure de carbone s'est révélé le meilleur capteur d'iode ; toutefois, il n'en capte qu'une partie, et de ce fait nous avons dû renoncer à notre projet : dissoudre l'iode dégagé dans le sulfure de carbone, et le doser par voie colorimétrique, la couleur violette étant la couleur idéale pour l'application de l'intensité des teintes. — Néanmoins, il retire au milieu aqueux suffisamment d'iode pour rendre la réaction de Fresenius irréversible dans le sens de la production d'iode, ce que nous avons pu vérifier.

Ainsi, nous proposons la modification suivante, qui peut convenir à la réaction dans des conditions de température et de concentration bien plus larges.

Réactifs nécessaires.

1. Nitrate d'ammonium en solution saturée.

2. Acide chlorhydrique pur.

3. Solution de KI à 50 %.

4 Liqueur titrée de $S^2O^3Na^2$ N/100.

5. Solution d'empois d'amidon à 2 %.

6 Sulfure de carbone exempt de H^2S.

Technique :

a) Minéralisation.

On calcine 0,5 à 1 g de sang dans une capsule de platine ou de porcelaine, au four à moufle ; lorsque le résidu ne contient plus que des cendres et du carbone difficile à comburer, on laisse refroidir et on traite par 2 à 3 cc de solution de NO^3NH^4 saturée, on évapore et calcine ; on répète l'opération jusqu'à obtention de cendres exemptes de charbon. On dissout dans HCl et dilue à 20 cc.

b) *Dosage.* — On ajoute dans 1 flacon Erlenmeyer, bouché à l'émeri, successivement à la liqueur 2 cc de solution d'iodure de potassium et 10 cc de sulfure de carbone. On laisse réagir 10 minutes, en agitant fortement à plusieurs reprises. Lorsque la réaction est achevée, on titre à l'aide d'une solution $\frac{N}{100}$ d'hyposulfite de soude en agitant encore, à chaque affusion de réactif. On ajoute 2 cc de solution d'empois d'amidon, lorsque l'iode n'est plus que faiblement coloré ; le titrage est effectué lorsque le liquide bleu est devenu incolore.

La quantité de fer présente dans la prise de sang est de

$(n \times 0{,}558)$ mg, n étant le nombre de cc d'hyposulfite consommés.

En définitive, nous manifesterons une préférence marquée pour le titrage des sels de fer à l'état ferreux.

B. - Méthodes colorimétriques

Selon la définition de Denigès, « la méthode colorimétrique consiste à déduire le poids d'une substance de l'intensité de teinte que communique cette substance ou ses produits de transformation, sous l'influence de réactifs appropriés, à un volume donné de solution, examinés dans des conditions déterminées comparativement à un étalon de teinte semblable ».

Le fer ionisé est connu pour sa facilité à s'engager en des ions complexes de couleur intense. La nature des composés qu'il donne n'est pas toujours bien définie, et les auteurs partagent des opinions différentes sur leur constitution. Nous n'avons matériellement pu vérifier toutes les méthodes colorimétriques proposées à l'analyse, car elles abondent et sont de valeur bien inégales. D'autre part, il est à signaler que bien des auteurs se sont contentés de comparer leur méthode à celle de Lapicque ou de Wong ; ces dernières, nous ne les avons pas acceptées comme procédés de référence, vu qu'elles sont dépourvues d'un caractère absolu, et que l'œil, répétons-le, est un organe imparfait.

Cependant, au point de vue pratique, on peut les recommander en raison de leur simplicité et de leur élégance.

A notre avis, une méthode colorimétrique nous apparaîtra d'autant meilleure qu'elle réalisera mieux les conditions suivantes :

a) la couleur obtenue sera celle d'un complexe stable, résultant lui aussi d'une réaction totale et irréversible ;

b) la couleur sera monochrome et de longueur d'onde au voisinage de la région du violet, vers les longueurs d'ondes faibles. Les couleurs violettes et indigo sont en effet plus facilement appréciables que les rouges et surtout les jaunes ;

c) les réactions ne doivent laisser en présence ni impureté, ni élément perturbateur ;

d) la loi de Beer-Lambert doit s'appliquer rigoureusement.

Nous étudierons la valeur des méthodes colorimétriques de dosage du fer en recherchant leur précision, leur sensibilité et leur comportement à l'égard de la loi Beer Lambert.

En conséquence, la valeur des méthodes colorimétriques sera discriminée surtout à l'aide des courbes d'étalonnage.

Ces courbes seront destinées à nous renseigner sur les lois qui régissent le rapport des intensités de coloration aux concentrations. Le rapport idéal et qui théoriquement devrait s'appliquer à toutes les réactions colorimétriques est donné par la loi de Beer-Lambert, d'après laquelle l'intensité des colorations est rigoureusement proportionnelle à celle des concentrations ; la courbe serait alors une droite.

Soit a la concentration d'une liqueur étalon (connue et déterminée) ;

a' la concentration inconnue à déterminer ;

h la hauteur du colorimètre sur laquelle on a déterminé la coloration de la solution a ;

h' la hauteur à déterminer, en d'identiques conditions, obtenue par le dosage de la liqueur a'.

$$\frac{a'}{a} = \frac{h}{h'}$$

Le rapport peut être exprimé, à la suite de plusieurs déterminations en une seule courbe, dont les abscisses portent les concentrations, et les ordonnées les hauteurs du colorimètre.

Dans nos dosages ferrométriques, nous nous sommes servis du colorimètre de Dubosq ; après nous être entraînés à son utilisation, nous avons pour chacune des réactions colorimétriques que nous voulions étudier, établi une courbe nous renseignant sur la teneur en sels de fer, par rapport à leurs colorations. Cette étude nous a permis d'une part de nous rendre compte de la sensibilité des méthodes de dosage préconisées, et par ailleurs de voir dans quelles mesures la loi de

Beer-Lambert est suivie avec précision par les divers complexes colorés du fer

Nous avons étudié ainsi la valeur des méthodes de Denigès, de Wong, de Leavell-Ellis, de Drilhon et de la méthode à l'acide sulfosalicylique, telle qu'elle est préconisée par J. Paviot, R Chevallier et L. Revol.

1. - Méthode chlorhydrométrique de Denigès

Les dosages à l'aide du complexe coloré $Fe^2Cl^6,2HCl$ nous ont paru peu sensibles en comparaison des autres ; alors que, comme nous verrons plus loin, il est parfaitement possible de doser des solutions, où on ne trouve dans un volume variant de 10 à 20 cc. que 1mg de fer, il n'en est pas de même pour cette méthode ci. La couleur jaune se prête mal aux déterminations, et celles-là ne nous ont donné satisfaction qu'au dessus de la concentration de 0,5%.

Voici les résultats auxquels nous sommes parvenus en dosant des solutions de perchlorure de fer :

Nous nous sommes servis d'une solution mère à 1% que nous avons diluée successivement aux diverses concentrations. Nous avons disposé une série de tubes à essais dans lesquels nous avons introduit successivement :

0,1 cc. puis 0,2 cc. et ainsi de suite jusqu'à un centimètre cube de solution à 1‰ de perchlorure de fer ; nous avons complété à 10 cc. de volume ; nous avons préparé une autre série de tubes, où nous avons introduit 1 puis 2 cc. ainsi de suite jusqu'à 10 cc. de solution à 1‰ ; enfin une 3e série de tubes contenant du sel ferrique à la concentration de 1 à 10‰ a été établie. Les dosages ont été effectués au colorimètre ; nous avions l'intention de dresser une première courbe, en prenant comme hauteur témoin la valeur 10 devant correspondre à la concentration de 0,1‰. Malgré que la couleur se soit légè-

rement développée, nous avons dû renoncer à ce travail, vu que les teintes étaient insuffisamment sensibles. Nous avons observé qu'un dosage ne pouvait être précis qu'au dessus de la concentration de 0,5°/₀₀. En prenant comme témoin la solution à 1°/₀₀ = la hauteur 10 du colorimètre, nous avons déterminé les hauteurs suivantes pour les colorations au perchlorure.

Concentration de la solution	Hauteur du calorimètre observée	Hauteur théorique
0,1°/₀₀		100
0,2°/₀₀		50
0,3°/₀₀		33,3
0,4°/₀₀		25
0,5	18,3	20
0,6	16,2	16,6
0,7	13,8	14,28
0,8	12,1	12,5
0,9	11,0	11,1
1,0	10	10
1,1	9,3	9.09
1,2	8,5	8,33
1,3	7,81	7,69
1,4	7,20	7,10
1,5	6,8	6,66
1,6	6,45	6,25
1,7	6,15	5,88
1,8	5,85	5,55
2°/₀₀	5,50	5,00
2,5°/₀₀	4,10	4,00
3°/₀₀	3,75	3,33
4°/₀₀	2,95	2,5

La méthode, malgré sa sensibilité inférieure à celle des suivantes, nous semble recommandable, vu qu'elle s'écarte très peu de la loi de Beer-Lambert. Nous donne-t-elle des résultats aussi précis pour le dosage du fer sanguin ?

(*Voir courbes colorimétriques, pages* 1 *et suivantes*).

Sur un même sang, nous avons effectué plusieurs déterminations ; à plusieurs parties aliquotes de ce sang, de poids sensiblement égal, nous avons ajouté une quantité déterminée de sels de fer, et avons comparé les résultats :

Sels de fer ajoutés au sang Gr. °/₀₀	Quantité de fer déterminé		
	Sang I	Sang II	Erreur
—	0 g 485	0 g 535	—
0 g 3	0 g 780	0 g 825	2 66%
0 g 5	0 g 970	1 g 010	3.16%
0 g 7	0 g 143	1 g 205	4.66%

Ainsi, la méthode de Denigès, quoi que fort peu sensible aux concentrations inférieures à 1 °/₀₀, nous a donné satisfaction en tant que méthode rapide et approximative de clinique ; cependant, en comparaison des autres, elle s'est révélée beaucoup moins précise, et somme toute beaucoup moins simple qu'elle ne paraît.

Méthode de Drilhon

De prime abord, elle nous semble plus avantageuse, en raison de la facilité plus grande de l'appréciation de la couleur bleue due à l'action du ferrocyanure de potassium sur les sels ferriques.

Cependant, elle présente un inconvénient lors de microdosages, car nous avons observé, en étudiant des solutions de titre croissant, un passage brusque de la coloration bleue à la coloration verte, lorsqu'on passe à une concentration inférieure à 0,17 °/₀₀. Ainsi, la méthode n'est applicable que pour des concentrations supérieures à 0,18 °/₀₀.

La courbe d'étalonnage se présente ainsi :

Concentration en sels ferriques	Hauteur du colorimètre	Hauteur théorique
0,18 °/₀₀	23	27,7
0,2 °/₀₀	20,5	25
0,3 °/₀₀	15,2	15,5
0,4	12,6	12,5
0,5	10	10
0,6	8,3	8,33
0,7	7,2	7,14
0,8	6,35	6,25
0,9	5,70	5,55
1, °/₀₀	5,21	5,00
1,5	4,5	3,3
2 °/₀₀	3,90	2,5

Ainsi, la méthode de Drilhon s'est montrée d'un degré de précision plus élevé que la précédente ; elle s'écarte peu de la loi de Beer-Lambert aux faibles concentrations ; pour des teneurs plus élevées en sels ferriques, supérieures à 2,5 °/₀₀, il faut éviter de l'utiliser ou du moins il faut diluer dans des proportions convenables.

Nous avons expérimenté la méthode également sur du sang additionné de quantités connues de sels de fer.

Sels de fer ajoutés	Quantité de fer déterminée		
	Sang I	Sang II	
—	0 g 518	0,528	— 2%
0 g 5	1 g 09	1,155	— 2%
1 g	1 g 525	1,518	+ 2%

En définitive, la méthode de Drilhon est exacte pour des concentrations allant de 0,35 à 1 g °/₀₀, et applicable pour des teneurs de 0,18 à 1,5 °/₀₀, en se servant de la courbe que nous avons établie. (*voir page* II)

Méthode de Wong-Servantie

Lors de l'essai de la méthode de Wong-Servantie, nous avons été amenés d'abord à expérimenter la valeur du procédé de défécation, qui remplace ici la minéralisation, puis à étudier, comme pour les autres techniques, la courbe colorimétrique.

1) La défécation a priori semble présenter de nombreux avantages par suite de sa simplicité. Mais sommes-nous sûrs d'extraire ainsi tout le fer, et tout le fer à l'état ferrique? Il nous semble nécessaire d'ajouter une légère modification à la technique de Wong, en exigeant que le contact entre le sang et l'acide persulfurique dure, non 15 minutes mais au moins 6 heures.

2) La courbe colorimétrique se présente ainsi pour les quantités de fer introduites :

Fer introduit	Hauteur du colorimètre observée	Hauteur théorique
0,1 mg	—	100
0,2	—	50
0,3	32,7	33,3
0,4	24,8	25
0,5	19,8	20
0,6	16,7	16,66
0,7	14,3	14,28
0,8	12,5	12,5
1	10	10
1,2	8,3	8,33
1,5	6.7	6,66
2	5	5
3	3,4	3,3
4	2,5	2,5
5	2	2

La courbe telle qu'elle s'est présentée, coïncide à peu près entièrement avec la courbe idéale, déduite de la loi de Beer-Lambert (*voir page* III).

La méthode, exacte pour des sels de fer, l'est-elle aussi pour le fer sanguin ? Comme précédemment, nous avons exécuté des dosages sur du sang que nous avons successivement additionnés de sels ferriques.

Sels de fer ajoutés gr. °/₀₀	Quantité de fer déterminée	Quantité théorique
—	0,544	—
0 g 5	1,08	1,044
—		
—	0,55	—
0 g 3	0,855	0,85

La méthode se révèle ainsi précise et exacte ; elle est appelée à supplanter le procédé de Lapicque plus complexe et moins sensible. La difficulté de la minéralisation est écartée, le fer est extrait grâce à une technique plus simple, moins onéreuse, moins dangereuse, aussi exacte. Les difficultés rencontrées par Lapicque sont écartées, en raison des concentrations plus fortes données aux liqueurs de sulfocyanates, et à celle de l'acide dans les tubes. Contrairement à l'opinion de Zizine, le sulfocyanate de potassium est plus indiqué que le sel d'ammonium et donne des résultats plus constants, plus réguliers.

Enfin, insistons un peu sur la facilité d'appréciation de la teinte, et l'avantage de l'extrême sensibilité de la réaction.

La réaction a lieu pour des concentrations de l'ordre de 1/1000 de mg°/₀₀ ; elle reste exacte pour les concentrations usuelles de microchimie et convient surtout pour les teneurs de 0,3 à 5 mg°/₀₀.

Méthode de Leavell et Ellis

Aussi satisfaisante nous a paru la méthode à l'acide thioglycolique.

Andréasch[1] lors d'études sur les acides-thiols a montré que les sels ferriques donnent avec l'acide thioglycolique une coloration bleue fugace ; il l'expliqua par une oxydation en acide thiodiglycolique. Nous ne pouvons partager cette opinion, car d'une part ce dernier acide n'est pas coloré, même en présence de sels de fer, et par ailleurs, d'autres oxydants capables de transformer l'acide thioglycolique en acide thiodiglycolique ne donnent aucune coloration (par exemple l'eau oxygénée). En présence de sels ammoniacaux, ou de préférence avec NH^4OH, il se produit avec les sels ferriques une coloration rouge violacée caractéristique, qui serait due d'après Andréasch à la formation d'un ferri thioglycolate d'ammonium.

$$Fe \begin{cases} S - CH^2 - COONH^4 \\ S - CH^2 - COONH^4 \\ S - CH^2 - COONH^4 \end{cases}$$

La réaction fut appliquée à l'analyse par Lyons, Hanzal, Burmeister, et mise au point par Leavell et Ellis.

Examinons la coube colorimétrique établie comme pour la méthode précédente (*voir page* IV).

Fer introduit	Hauteur du colorimètre observée	Hauteur théorique
0,1 °/₀₀	—	100
0,2	—	50
0,3	—	33,3
0,4	24	25
0,5	20,2	20

(1) Ber. de D. Chem. Ges. XII, 1879 p. 1390-1393.

Fer introduit	Hauteur du colorimètre observée	Hauteur théorique
0,7 °/₀₀	14,18	14,28
0,8	12,43	12,5
0,9	11,00	11,11
1	10	10
1,1	9,05	9,09
1,2	8,31	8,33
1,5	6,60	6,6
2	5,0	5,0
2,5	4,0	4,0
3	3,30	3,33
3,5	2,9	3,0
4	2,4	2,5
5	2,05	2

Ici encore, la courbe, aux erreurs expérimentales près, se confond avec la courbe théorique ; lorsqu'on effectue un dosage à l'acide thioglycolique on peut donc être certain de sa précision.

En est-il de même pour le fer sanguin ? A du sang calciné nous avons ajouté des quantités croissantes de sels de fer.

Fer ajouté mg °/₀₀	Quantité de fer déterminée	Quantité théorique
—	0,562	—
0,4	0,957	0,962
—	0,548	—
0,2	0,743	0,748
0,3	0,842	0,848

La méthode convient donc aussi pour le dosage du fer sanguin, qu'il soit obtenu par calcination, ou par extraction selon le mode de Wong-Servantie. La coloration n'est donc

pas influencée par la présence d'acides tungstique ou persulfurique ; on peut donc éviter la minéralisation. En outre, elle présente l'avantage que la longueur d'onde de la couleur formée se trouve près du violet 30u, le plus sensible et appréciable à l'œil. Toutefois, la sensibilité de la réaction est légèrement inférieure à celle de la méthode précédente.

Méthodes à l'acide sulfosalicylique

Il nous reste à étudier les méthodes à l'acide sulfosalicylique. Lorbeer en 1928 (87) proposa d'adapter la réaction que donnent les sels ferriques avec l'acide sulfosalicylique, à l'analyse microchimique ; avec cet acide, il apparaît une coloration rouge caractéristique ; si l'on ajoute de l'ammoniaque, la couleur jaune obtenue est proportionnelle à la concentration en fer.

Voyons la valeur de la méthode Korenmann. La couleur jaune du complexe sulfosalicylé est bien plus intense que celle du perchlorure de fer ; cependant des mesures ne peuvent être effectuées que si le fer se trouve dans la solution à une concentration supérieure à 0,5 mg dans 10 cc, soit au taux de 0,05 °/₀₀. Voyons la courbe colorimétrique d'étalonnage que nous avons établie en nous servant des perfectionnements donnés à la méthode par Paviot, Chevallier et Revol (1).

Fer introduit	Hauteur du colorimètre observé	Hauteur théorique
0,4 mg	—	25
0,5	24,15	20
0,6	21,05	16,6
0,7	14,25	14,28
0,8	12,6	12,5
0,9	11,05	11,1
1	10	10

(*Voir courbe page* v).

(1) (C. R. Soc. Biol., T. 99, p. 1749 — 1928).

Fer introduit	Hauteur du colorimètre observé	Hauteur théorique
1,3 mg	7,75	7,69
1,5	6,7	6,66
2	5,25	5
3	3,55	3,33
4	2,75	2,5
5	2,15	2

La courbe se rapproche de celle de Beer-Lambert, aux erreurs expérimentales près, sauf aux concentrations inférieures à 0,07 °/₀₀, Il est recommandable donc de n'employer cette méthode pour le dosage du fer que lorsque sa teneur dépasse 7/10 de mgr. Néanmoins elle nous a paru précise, surtout avec les modifications apportées par Paviot, Chevallier et Revol.

Voyons les résultats obtenus sur le fer sanguin.

Sels de fer ajoutés au sang g. °/₀₀	Quantité de fer déterminée	Quantité théorique
—	0,465	—
0,1	0,562	0,565
0,3	0,748	0,765
0,4	0,853	0,865
—	0,495	—
0,2	0,691	0,695
0,5	0,983	0,995

Lors de l'addition de sels de fer au sang, la méthode s'est montrée moins régulière, moins précise que les précédentes; néanmoins elle reste applicable au microdosage du fer sanguin.

Ayant ainsi passé en revue chaque méthode expérimentée, individuellement, il nous reste à les comparer entre elles. D'ores et déjà nous pouvons affirmer en titrimétrie la supériorité des procédés de Fontès et Thivolle, et de Fleury-Marque, et en colorimétrie, de Wong et de Leavell-Ellis.

Chapitre III

Méthodes nouvelles

1. - Méthode molybdochromométrique

A la suite de notre étude des méthodes manganimétriques, nous avons été amenés à penser essayer d'autres liqueurs oxydantes, dont l'agent actif est CrO^3.

Elles sont en général moins utilisées dans l'analyse chimique du fer, par suite de leur degré de sensibilité moindre.

Penny dose directement le sel ferreux en solution à l'aide d'une liqueur titrée de bichromate de potassium ; l'oxydation se fait moins bien qu'avec les permanganates ; la fin de la réaction est déterminée par des essais à la touche, à l'aide d'une solution de ferricyanure de potassium, réactif insuffisamment sensible. J. Knop, P. Rothe et A. P. Solrinko (81) proposèrent un perfectionnement dont ils se servirent pour doser le fer dans les minerais. La solution de sel ferreux dans l'acide chlorhydrique est obtenue au moyen de chlorure stanneux, dont l'excès sera éliminé grâce au bichlorure de mercure. On opère en milieu acide (acides sulfurique et phosphorique), et on ajoute quelques gouttes de solution de diphénylamine ; on effectue le titrage à l'aide d'une liqueur N/10 de $Cr^2O^7K^2$ jusqu'à l'apparition d'une coloration bleu violacée due à la formation d'oxyde de diphénylamine.

Nous inspirant de ces techniques, nous nous sommes proposé de mettre au point une méthode chromométrique, malgré ces deux inconvénients : la lenteur de l'oxydation et la difficulté de l'appréciation de la fin de la réaction. Nous avons pu lever ces deux difficultés, la première facilement, la seconde

en adaptant la technique de Rothe à la biochimie. En principe le fer sanguin, après minéralisation, est réduit par le mercure à l'état de sel ferreux, puis introduit dans la même combinaison molybdique que dans la méthode de Fontès et Thivole ; il apparaît une forte coloration due au bleu de molybdène ; celui-ci est oxydé par un volume à déterminer de liqueur de dichromate de potassium en présence de diphénylamine. Lors de l'addition goutte à goutte de ce réactif, l'oxyde de molybdène réduit se décolore ; le terme de la réaction est donné par l'apparition d'une coloration violette.

Sans doute ce procédé présente-t-il encore des difficultés, vu que le virage est moins net qu'avec la liqueur de permanganate, mais parmi les méthodes à base de liqueur chromique, nous croyons avoir réussi à l'adapter à ce dosage particulier. De plus ce procédé a un avantage : la liqueur de dichromate reste indéfiniment stable, son titre ne nécessite pas une détermination préalable ; en conséquence nous estimons que notre méthode pourra rendre des services aux chercheurs qui ne seront pas appelés à doser en série par volumétrie le fer sanguin, et en général le fer aux petites doses.

Voici notre technique opératoire :

a) *Réactifs nécessaires.*

1. Solution saturée de NO^3NH^4.

2. Acide chlorhydrique pur.

3. Réactif phosphomolybdique de Fontès et Thivolle.

4. Mercure pur bidistillé.

5. Solution N/400 ou N/200 de $Cr^2O^7K^2$ obtenu en dissolvant 49 g de sel pur et sec dans 500 cc d'eau bidistillée et on dilue au quarantième ou au vingtième.

6. Solution à 2% dans l'acide sulfurique pur de diphénylamine.

B. - Mode opératoire

La technique comporte autant de difficultés que celles de Fontès-Thivolle ou Fleury-Marque.

Pour un dosage absolument rigoureux, la calcination et l'isolement du fer devront être exécutés selon la technique de Fontès-Thivolle. Cependant, nous avons vérifié que les pyrophosphates et les sels de calcium ne gênent guère la réaction, aussi suffira-t-il d'effectuer une minéralisation simple.

Dans une capsule de platine ou de porcelaine, on pèse 2 g de sang environ, préalablement oxalaté, on évapore et on calcine au four à moufle au rouge sombre ; puis on laisse refroidir, et on arrose les cendres noires, encore riches en carbone, à l'aide de quelques gouttes de solution de nitrate, on évapore et calcine. L'opération doit être reprise au moins 5 fois, jusqu'à ce que tout le carbone ait disparu.

On dissout les cendres dans 2 cc HCl pur; on introduit dans un petit flacon Erlenmeyer bouché à l'émeri. On lave la capsule à l'eau distillée, et complète à un volume d'environ 20 cc. On porte au bain-marie bouillant 10 minutes, afin de chasser l'excès d'acide chlorhydrique ; puis on introduit 1 à 2 cc de mercure pur bidistillé. On agite fortement durant 10 minutes encore ; le sel ferrique est réduit en sel ferreux, et il se dépose du calomel mêlé de mercure émulsionné et de sousoxyde noir. On filtre et recueille dans un Erlenmeyer renfermant déjà 5 cc de solution d'acide phosphomolybdique.

On rince le filtre à l'eau distillée tiède ; le filtrat, dès qu'il arrive en contact avec le réactif se colore en bleu intense. La coloration qui apparaît ainsi, nous avons essayé de la déterminer directement, par voie colorimétrique ; malheureusement les résultats obtenus ont été irréguliers.

Titrage. — On ajoute goutte à goutte de la solution N/400

de $Cr^2O^7K^2$ contenu dans une burette de 20 cc, muni d'une pince de Mohr. La liqueur se décolore très vite, et il apparaît peu à peu, de plus en plus nette, la couleur verte des sels chromeux. C'est à ce moment-là qu'on ajoute 1 cc de solution sulfurique de diphénylamine ; on continue, de façon plus prudente, l'addition de liqueur chromique et le titrage est terminé à l'apparition de la couleur bleu violacée intense. Du résultat obtenu, il faut déduire 0,05 cc, représentant l'excès de $Cr^2O^7K^2$ qui a attaqué le réactif organique.

Soit n le nombre corrigé de cc de liqueur de $Cr^2O^7K^2$ utilisé.

P le poids de la prise de sang en grammes.

t le titre de la liqueur ; si elle est à N/400, 1 cc correspond à 0,140 mg de fer.

$$Fe \text{ en mg pour 1 kg de sang} = \frac{n.t.1000}{P}$$

Toutefois, cette méthode présente quelques inconvénients dont le principal consiste en l'usage de solutions de sulfates de diphénylamine ; cet indicateur de fin de réaction, certes, nous a donné satisfaction par sa sensibilité ; cependant, nous avons cherché à éviter son emploi, et nous nous sommes demandé si l'on pouvait effectuer un dosage direct du fer sanguin au moyen de $Cr^2O^7K^2$. Nous inspirant de la méthode de M. Nicloux, relative au dosage de l'alcool par le bichromate de potassium, nous avons essayé de mettre au point une méthode analogue pour doser le fer sanguin.

Le principe consiste en la préparation dans 3 tubes de solution de sel ferreux additionné d'acide sulfurique, de même volume et de même concentration, puis leur dosage titrimétrique au moyen de la liqueur de bichromate : on oxyde totalement le sel ferreux contenu dans le premier tube, et on ajoute un très léger excès de liqueur oxydante ; la couleur de la solution sera d'un vert jaunâtre, dû à un mélange de sel de chrome et de dichromate. Dans le deuxième, on introduit un volume

de liqueur oxydante légèrement inférieur ; la solution à titrer présente une couleur vert franche due à la présence des seuls sels de chrome. Ces deux tubes doivent servir de témoin, et leur couleur respective doit représenter les limites extrêmes entre lesquelles doit être la couleur de fin de réaction (couleur verte se dégradant très légèrement vers le jaune) ; on effectue enfin le dosage sur le troisième tube, dans lequel on ajoute du dichromate jusqu'à obtention de cette couleur intermédiaire, que l'on apprécie en se servant des tubes témoins.

Nous n'avons pu exécuter cette série de réactions directement sur les solutions de sels ferreux, les fins de réaction étant très difficiles à observer. Aussi avons nous préféré traiter par le dichromate une solution dont les sels ferreux ont déjà réduit l'oxyde de molybdène.

Nous avons préparé 3 tubes, et introduit dans chacun 5 cc de solution de sel ferreux renfermant 1 g de fer par litre, puis 0,8 cc d'acide sulfurique pur exempt de fer. Nous avons ajouté ensuite dans chacun 2 cc de réactif phosphomolybdique, et laissé quelques minutes se développer la coloration bleue, puis nous avons ajouté dans le premier tube goutte à goutte de la solution $Cr^2O^7K^2$ N/400 ; l'oxyde de molybdène se décolore, et la couleur bleue fait place peu à peu à la couleur verte des sels de chrome. Nous avons continué l'affusion de dichromate jusqu'à apparition d'une couleur verte légèrement mêlée de jaune. Dans le deuxième tube, nous avons ajouté du dichromate avec précaution en ayant soin de conserver la couleur verte sans mélange avec une autre ; le résultat est en défaut, car la réaction n'est pas achevée. Ces deux tubes ont été conservés comme repères, l'un vert franc, l'autre vert jaunâtre ; la fin de la réaction est déterminée par une couleur intermédiaire entre les deux, c'est-à-dire le vert se dégradant légèrement vers le jaune. C'est cette coloration qu'il s'agit d'obtenir avec le troisième tube.

Nous avons ainsi exécuté une série de dosages, portant

les uns sur des solutions de sels de fer, les autres sur des prises de sang.

Fer à déterminer (en cc de sol. à 1°/₀₀)	Nombre de cc consommés de sol. $Cr^2O^7K^2$ N/400	Volume théorique	Erreur
10 mg tube 1	7,3		
— 2	7,0	7,15	— 2%
— 3	7,05		
5 mg — 1	3,5		
— 2	3,3	3,575	
— 3	3,5		— 3%

Par cette méthode nous avons dosé le fer sanguin à partir de sang humain calciné. Nous avons prélevé dans trois tubes chaque fois 2 cc de sang, puis nous avons ajouté au deuxième tube 0,2 cc de solution à 1°/₀, de sulfate ferrique, au troisième tube 0,5 cc de cette même solution. Voici les résultats auxquels nous sommes parvenus, après minéralisation :

Fer introduit en mg °/₀₀	Quantité de fer déterminé en g °/₀₀	Quantité théorique	Erreur
—	0,480	—	
0,2	0,692	0,680	+ 2%
0,5	0,998	0,980	+ 2%
—	0,533	—	
0,2	0,748	0,733	+ 2%
0,5	1,060	1,033	+ 3%
—	0,512	—	
0,2	0,742	0,712	+ 2%
0,5	1,025	1,012	+ 4%

Ainsi la méthode chromométrique est applicable au microdosage des sels de fer, et en particulier au dosage du fer sanguin. Nous reviendrons sur ce sujet lors de la comparaison simultanée des procédés de dosage ferrométrique.

2 - Méthode colorimétrique à l'acide phénylpyruvique

A la suite de l'essai des méthodes colorimétriques nous avons estimé qu'un dosage des sels de fer pouvait être exécuté à l'aide de la réaction que donne avec eux l'acide phénylpyruvique.

Cet acide α cétonique a la propriété de donner avec les sels de fer une coloration verte, réaction due à un phénomène d'énolisation :

$$C^6H^5 - CH^2 - CO - COOH \Longrightarrow C^6H^5 - CH = C(OH) - COOH$$

Nous nous sommes proposé, sur les conseils de M. le Professeur P. Cordier, de l'étudier en vue du dosage des sels de fer, et par suite du fer sanguin.

Cet acide peut être obtenu aisément selon le procédé indiqué par Erlenmeyer (1) et mis au point par M. Bougault (2), qui consiste à condenser le cyanure de benzyle avec l'oxalate d'éthyle en présence d'alcoolate de sodium, et à hydrolyser l'éther α-cyané obtenu.

Si l'on prépare une solution de Fe^2Cl^6, de telle sorte qu'elle renferme 1 g de fer par litre, et qu'on fait agir sur 1 cc par exemple de la liqueur, diluée à son dixième, 1 cc de solution saturée de réactif, la coloration se dégage aussitôt : d'abord jaunâtre, puis verte ; après 2 minutes elle a atteint son maximum d'intensité. Elle est assez fugace car en six heures elle disparait.

Nous avons cherché à établir les conditions optima de réaction, afin de nous en servir pour un dosage.

a) L'acide phénylpyruvique étant relativement altérable, nous nous sommes servis de son sel de sodium. Le sel est as-

(1) Erlenmeyer. - Liebigs Annalen t. 271 p. 172 - 1892
t. 333 p. 228 - 1904

(2) Bougault. - Journ. Pharm. Chim. (7ᵉS) T. X. 1914 p. 302

sez soluble ; l'expérience nous a montré que pour les mesures colorimétriques, la quantité de réactif à employer doit excéder largement la quantité théorique nécessaire. Nous avons préparé une solution à 1% dans l'eau bidistillée, nous avons laissé au contact plusieurs jours, puis nous avons filtré. Il est plus simple de triturer le produit au mortier en le dissolvant à l'aide d'eau distillée chaude, puis de filtrer. Nous avons conservé la solution dans un flacon brun bouché à l'émeri, à l'abri de la lumière. Il serait même recommandable de la recouvrir d'une fine couche de toluène : le sel se conserve de façon fort satisfaisante à sec et à l'obscurité ; en solution, il s'altère. Aussi n'en faut-il préparer que de petites quantités, et au moment de l'emploi.

b) Le sel de fer doit se trouver de préférence à l'état de perchlorure, exempt d'un trop grand excès de HCl ; le *p*H de la solution ne doit en aucun cas être inférieur à 5,8.

c) La réaction :

a) elle ne se produit qu'avec des corps purs ; si on essaie de l'obtenir avec du fer obtenu par minéralisation, et dissous avec le reste des cendres dans HCl, elle ne se produit pas ; il faut donc éliminer les phosphates, et calciner suivant le mode opératoire de Fontès et Thivolle.

b) elle ne se produit qu'entre les *p*H 5,8 et 7,3. La coloration, très fragile, est détruite facilement par un excès d'SO^4H^2, ou d'HCl, ou l'addition d'alcalis.

Lors de nos essais sur l'action de NH^4OH, nous avons constaté le passage de la couleur verte à une couleur rouge intense, analogue à celle des sulfocyanates ferriques ; nous retiendrons cette réaction. Les oxydants tels que l'eau oxygénée n'altèrent pas de suite la coloration. les réducteurs faibles (aldéhydes, formols) sont sans action. Les sels neutres, tels que NaCl gênent enfin la réaction.

c) elle ne se produit qu'à froid. Une légère élévation de la

température au-dessus de +40° suffit à la détruire. Dans de telles conditions, pouvons-nous utiliser la réaction pour un dosage ? Il faudrait pour cela réaliser les conditions suivantes :

a) grande sensibilité de la réaction.

b) facilité d'appréciation de la teinte.

c) proportionnalité rigoureuse entre l'intensité de la couleur et la richesse en fer.

a) La sensibilité de la réaction est extrême ; elle est supérieure à celle des réactions colorimétriques étudiées, sauf celle au sulfocyanate ; elle permet l'appréciation au centième de milligramme ; la réaction se produit à partir de la concentration de 0,02°/₀₀.

b) La teinte est située dans la région des petites longueurs d'ondes du spectre visible ; elle est donc des plus faciles à apprécier.

c) Y a-t-il proportionnalité ?

Nous avons d'abord tenté de construire une échelle colorimétrique dans 10 tubes à essais calibrés également et gradués à 10 cc., nous avons introduit 1 cc. de liqueur étalon de perchlorure de fer (renfermant 1 gr. par litre de fer) dans le premier tube, 2 dans le second, puis 1 cc. de plus dans chaque tube suivant ; nous avons complété partout à 10 cc. puis nous avons introduit 1 cc. de solution de phénylpyruvate. La coloration est évidemment d'autant plus intense que la concentration en fer est plus élevée, mais nous n'y avons pas trouvé de proportionnalité. Toutefois la différence de teinte entre le premier et le second tube nous a paru suffisamment tranchée, pour que nous essayions une deuxième échelle.

Dans une série de 10 tubes, nous avons introduit 1 cc., puis 1,1, puis 1,2 etc. jusqu'à 2 cc. de liqueur ferrique, nous avons complété à 10 cc., avons ajouté du phénylpyruvate et examiné : la proportionnalité se manifeste mieux, néanmoins elle n'est pas absolue.

Si donc, on veut faire un dosage de sels ferriques à l'aide de phénylpyruvate, en observant la teinte verte, on ne pourra opérer qu'aux petites concentrations ; une mise au point est donc nécessaire. (*Voir courbe n°* VI)

De même que pour les autres méthodes colorimétriques, nous avons établi la courbe d'étalonnage du phénylpyruvate ferrique en solution.

Fer introduit	Hauteur du colorimètre observé	Hauteur théorique
0.1 mg.	Dosage impossible	100
0.2	—	50
0 3	—	33.3
0.4	—	25
0 5	18.1	20
0.6	15.2	16.66
0.7	13 3	14.28
0 8	12.05	12.5
0 9	—	11.1
1	10	10
1.2	8.4	8.33
1.4	7.3	7.14
1.5	6.8	6.66
2	5.15	5.00
2.5	4.1	4.00
3	4.0	3.33
4	3.8	2.5
5	3.25	2

La courbe ainsi s'est montrée très différente de la courbe théorique pour des taux inférieurs à 0,07 °/₀₀ et surtout pour des taux supérieurs à 0,15 °/₀₀ ; c'est donc dans les limites comprises entre les concentrations de 0,05 °/₀₀ à 0,2 °/₀₀ que la réaction au phénylpyruvate se révèle exacte ; elle est particulièrement précise entre les concentrations de 0,08 à 0,15 °/₀₀.

Pour les autres teneurs, il est recommandable de se reporter à la courbe d'étalonnage de correction ; pour des teneurs élevées en sels de fer, il suffit de diluer suffisamment les solutions.

Dosage des sels de fer au moyen de l'acide phénylpyruvique en milieu ammoniacal

Nous avons vu qu'en ajoutant de l'ammoniaque à la solution de phénylpyruvate de fer, lorsque sa coloration est devenue maximum, c'est-à-dire après deux minutes de réaction, il se produit une coloration rouge intense, analogue à celle du sulfocyanure ferrique. Est-il possible d'utiliser cette coloration pour des dosages colorimétriques ? Il se pose là les mêmes problèmes que pour toutes les autres méthodes colorimétriques :

a) la sensibilité. Certes la couleur rouge obtenue est moins intense que la teinte verte précédente ; néanmoins elle est aussi sensible que la couleur des thioglycolates ; la réaction est perceptible aux concentrations de 0,03‰.

b) l'appréciation de la teinte.

Moins nette que la teinte verte précédente, néanmoins, elle l'est autant que celle des sulfocyanates ; elle est rouge intense à forte concentration, et jaune orangé à forte dilution.

c) le problème de la proportionnalité.

Pouvons-nous appliquer la réaction au dosage du fer sanguin ?

La réaction est plus facile à réaliser, car elle ne dépend pas du *p*H, qui ne change sensiblement pas du fait de l'excédent de liqueur ammoniacale ; la couleur, quoique moins intense, est bien plus stable et invariable dans son aspect. Néanmoins elle ne se produit non plus qu'à la température du laboratoire. Enfin elle n'est pas influencée par les phosphates ni les sels neutres ; elle réussit aussi avec le fer obtenu par calcination, en présence des autres sels solubles des cendres qu'il n'est pas nécessaire d'éliminer.

En conséquence, voici la technique colorimétrique à laquelle nous nous sommes arrêtés :

1) *Réactifs nécessaires.*

1 Solution saturée de nitrate d'ammonium ;

2. Acide chlorhydrique pur ;

3. Ammoniaque liquide officinale ;

4 Solution saturée de phénylpyruvate de sodium ;

5 Solution étalon de fer : on dissout 1 g. de fer pur dans 10 cc. HCl, à chaud au bain marie à 80° jusqu'à fin de dégagement d'hydrogène. On complète à un 1 litre et on vérifie le titre. On peut préparer une solution ex-tempore à partir du perchlorure de fer officinal pur, qui est une solution à 112‰ de fer ; on la dilue à 1000/112 soit 8,9 cc, par litre. On vérifie le titre à l'aide des méthodes de Fleury ou de Fontès-Thivolle.

2) *Mode opératoire.*

Lorsqu'on désire se servir de la réaction à la coloration verte, on est obligé de calciner le sang comme le préconisent Fontès et Thivolle.

En revanche, si on utilise la réaction au phénylpyruvate, en milieu ammoniacal, il suffit de calciner suivant les méthodes classiques. Le sang, à raison de 2 g. environ, citraté, ou oxalaté, ou laqué à l'aide de NH^3 (à l'exclusion de l'emploi de fluorures ou d'acide tungstique), est calciné dans une capsule de platine ou de porcelaine. Après évaporation, on refroidit et agite la masse avec du NO^3NH^4 en solution saturée, puis on recommence la calcination au rouge sombre, au four à moufle. Lorsque les cendres ne renferment plus de carbone, on les dissout dans de l'acide chlorhydrique, puis on dilue à un volume de 20 cc. environ dans une capsule. On place celle-ci durant 20 minutes soit au bain-marie bouillant, soit à l'étuve à 100°, afin d'éliminer l'excès de HCl. On ramène au volume de 20 cc., dont on prélève la moitié pour le dosage.

On met dans un autre tube 1 cc. de la liqueur étalon, on complète à l'aide d'eau distillée à 10 cc.. Puis dans chacun des deux tubes, on introduit 1 cc. de solution saturée de phénylpyruvate de soude. Il apparaît une couleur verte intense que l'on peut déjà examiner au colorimètre ; puis dans les godets même de l'appareil de Dubosq, renfermant déjà de part et d'autre un volume égal de liqueur, on introduit 1 cc. d'ammoniaque officinale ; on agite, on laisse reposer 2 à 3 minutes ; la couleur orangée-rouge caractéristique se développe ; enfin, on compare et calcule d'après la différence des intensités, la teneur en sels de fer.

Voyons les résultats auxquels nous sommes parvenus en cherchant à établir la courbe colorimétrique d'étalonnage. (*Voir page* VII)

Fer introduit g°/oo	Hauteur du colorimètre observé	Hauteur théorique
0 1	—	100
0 2	—	50
0.3	—	33.3
0.5	20	20
0.6	14 9	16 6
0 7	14 1	14.28
0.8	12 4	12.5
0.9	—	11.1
1	10	10
1 2	—	8.33
1.5	7 4	6.66
2	5.0	5
2.5	4 0	4
3	3 4	3 33
3.33	3.0	3.0
4	2 55	2 5
5	2 0	2

A l'exception de deux résultats aberrants (trouvés pour les concentrations de 0,06 °/oo et 0,15 °/oo), en tenant compte des

erreurs expérimentales, nous avons ainsi pu vérifier que la réaction au phénylpyruvate en milieu ammoniacal suivait la loi de Beer-Lambert ; en conséquence cette réaction est utilisable aux fins de dosage des sels ferriques. En est-il de même en ce qui concerne le fer sanguin ?

Nous avons opéré à ce propos comme pour les autres méthodes ; en nous servant pour plusieurs déterminations du même sang, auquel nous ajoutons des quantités variables de sels de fer.

Fer ajouté g °/₀₀	Quantité de fer déterminé	Quantité théorique
—	0,472	—
0,2	0,688	0,672
0,5	0,983	0,972
—	0,458	—
0,2	0,674	0,658
0,5	0,977	0,958
—	0,440	—
0,2	0,643	0,640
0,5	0,948	0,940

Les résultats obtenus se sont montrés, quoiqu'il y ait eu la plupart du temps erreur par excès, à notre avis, suffisamment satisfaisants pour nous permettre de préconiser cette méthode ; bien entendu, il ne pourra être question de l'admettre comme exacte que si ses résultats concordent avec ceux obtenus à l'aide d'un procédé de référence, à la suite d'une étude à la fois comparative et simultanée sur les mêmes prises d'essai. D'ores et déjà néanmoins, nous pouvons trouver à notre méthode quelques avantages :

a) la sensibilité de la réaction ; pour la recherche du fer aux doses infinitésimales, le phénylpyruvate de sodium convient de façon très satisfaisante, et pour le dosage on pourra se servir du même sel en présence de NH^3.

b) la rapidité des déterminations ; la couleur verte atteindra son intensité maxima après deux minutes, au bout desquelles il convient d'introduire l'ammoniaque.

Ainsi croyons-nous cette méthode susceptible de rendre des services dans la recherche pratique.

Chapitre IV

Etude comparée et simultanée des méthodes ferrométriques et hémoglobinimétriques

Nos travaux ont porté sur trois séries de recherches :

1. Sur des solutions étalon.
2. Sur des sangs normaux.
3 Sur des sangs que nous pouvions estimer anormaux.

Dans le but de comparer la valeur des méthodes analytiques essayées, nous les avons étudiées successivement avec des liqueurs ferreuses ou ferriques, exemptes de toutes impuretés. A cet effet, nous avons préparé plusieurs liqueurs étalon.

Toutes ont été préparées en partant de fer ("de fils à fleurs") pur, qui présentait notamment tous les caractères de pureté du Codex 1938. En voici plusieurs :

1. La solution du Codex, contenant un gramme de fer pour mille, à l'état de sulfate ferrique.

"Dans un matras de 125 cc, dissolvez 10 cg de fils à fleurs

dans 20 cc environ d'eau distillée additionnée d'un demi centimètre cube d'acide sulfurique officinal. Ajoutez 10 gouttes d'acide azotique officinal. Faites bouillir pendant 10 minutes environ. Après refroidissement, transvasez le liquide dans une fiole jaugée de 100 cc, ajoutez les eaux de lavage du matras, agitez et complétez le volume de 100 cc avec de l'eau distillée. Mélangez".

2 La solution de Zizine à 0,1 de ferricum par litre. Dans une capsule de porcelaine, on traite 0,1 g de fils de clavecin purs par 4 cc d'acide sulfurique et 50 cc d'eau distillée. Après dissolution, à chaud, on oxyde à l'aide d'une liqueur de permanganate N/10, jusqu'à apparition d'une légère coloration rose stable. Le tout est introduit dans un ballon jaugé, et complété à un litre.

3. La solution étalon de Wong à 1 °/₀₀ de fer. On traite 0g70 de sulfate ferreux ammoniacal pur par 20 cc d'acide sulfurique à 10%, après l'avoir dissous dans 50 cc d'eau. On oxyde également au permanganate, et complète à un litre.

4. Notre étalon au perchlorure de fer, renfermant aussi 1 g de fer au litre.

Fils à fleurs	1 g.
Acide chlorhydrique	10 cc.
Eau distillée	100 cc.

Dans un Erlenmeyer, on introduit le fer et l'acide ; on laisse réagir d'abord à froid ; puis on le place sur un bain-marie électrique bouillant, au moins 20 minutes jusqu'à dissolution du métal. On ajoute de l'eau distillée, et on laisse évaporer une partie de l'excès de HCl ; puis, on peroxyde a l'aide d'eau oxygénée, dont l'excès sera dissocié par l'action de la chaleur ; enfin, on complète à un litre.

L'étalon du Codex et celui que nous proposons sont les seuls à ne renfermer qu'un sel de fer ; les autres qui renferment

d'autres sels sont susceptibles de fausser notamment les réactions colorimétriques.

Les sels ammoniacaux, et surtout la présence du manganèse, dont les réactions sont voisines de celles du fer, ont une influence nocive sur le développement des colorations, et la présence de manganèse est une cause d'erreur notable si on utilise comme réactif l'acide thioglycolique, l'acide sulfosalicylique, ou l'acide phénylpyruvique.

Nous utiliserons en général l'étalon Codex, réservant l'étalon au perchlorure pour la méthode au phénylpyruvate.

Pour les méthodes étalon, nous avons trouvé les résultats suivants, en dosant des concentrations croissantes :

a) à l'aide de l'étalon du Codex :

	Teneur en fer			
Prise d'essai :	1 cc	1 mg	4 cc	4 mg	9 cc	9 mg
Résultat théorique		1,000		4,000		9,000
Méthode Fontès-Thivolle		0,99		3,95		9,2
— Molybdo chromométrique		1,2		4,2		9,4
— Bertrand		0,96		3,8		8,7
— Fleury-Marque		0,99		3,9		8,8
— Lasausse		0,98		3,7		8,7
— — modifié		0,98		3,8		8,8
— Denigès		0,99		3,75		8,7
— Drilhon		0,97		3,4		8,6
— Wong-Servantie		0,97		3,7		8,9
— Leavell-Ellis		0,99		3,9		9,1
— Korenmann		0,95		3,5		8.5

b) Usage de notre étalon au Fe^2Cl^6

Prise d'essai :	1 cc=1 mg	4 cc=4 mg	9 cc=9 mg
Résultat théorique	1,000	4.000	9,000
Méthode Fontès-Thivolle	1,0	4,05	9,1
— Molybdo chromométrique	0,992	4,10	9,2
— Bertrand	0,958	3,8	8,7
— Fleury-Marque	0,993	3,9	9,05
— Lasausse	0,989	4,1	9,10
— — modifié	0,989	4,2	9,05
— Denigès	0,956	4,1	8,8
— Drilhon	1,012	4,1	8,7
— Wong-Servantie	0,977	3,95	8,7
— Leavell-Ellis	1,054	3,97	8,9
— Korenmann	0,946	3,7	8,23
Méthode au phénylpyruvate	0,973	3,9	8,8

2e série de recherches

Dosage du fer dans le sang

On peut utiliser la solution étalon du Codex, ou la nôtre, pour toutes les méthodes. Voyons à quels résultats nous sommes parvenus en dosant le fer dans le sang. Bien entendu, nous avons fait appel au même sang pour chaque série de recherches, qui comportent à la fois le titrage de l'hémoglobine et du fer.

A°) Sang d'homme normal

1er Echantillon

Nombre d'hématies..... ... 4.800,000
Valeur globulaire..... 1,05

	Fer	Hb trouvé
Méthode Tallqvist	—	17,0
— Gowers		17,4
— Sahli.....		16,4
— Hellige.....		16,2
— Newcomer		16,0
— Wu		17,2
— Fontès-Thivolle..... .	0,551	
— $Cr^2O^7K^2$	0,557	
— Bertrand	0,543	
— Lasausse	0,548	
— — modifié.....	0,555	
— Denigès	0,551	
— Drilhon	0,543	
— Wong-Servantie	0,542	
— Leavell-Ellis.....	0,554	
— Korenmann.....	0,538	
— Au phénylpyruvate	0,556	

Sang d'homme

2e Echantillon

	Fe	Hb trouvé	Hb calculé
Méthode Tallqvist		17,4	
— Gowers.....		17,3	
— Sahli.....		16,4	
— Hellige		16,8	
— Newcomer.....		16,2	
— Wu		17,2	

	Fe	Hb calculé
Méthode Fontès-Thivolle	0,535	16,05
— $Cr^2O^7K^2$	0,528	15,74
— Bertrand	0,519	15,57
— Fleury-Marque	0,537	16,11
— Lasausse	0,52	15,6
— — modifié ...	0,538	16,14
— Denigès	0,508	15,24
— Drilhon	0,523	15,69
— Wong Servantie ..	0,525	15,75
— Leavell-Ellis	0,535	16,05
— Rosanor.....	0,517	15,51
— au phénylpyruvate .	0,528	15,84

Sang d'homme

3e Echantillon

Hématies.....	4.500.000
Hb (Tallqvist)	100 °/o
Valeur globulaire	0,978

Hémoglobine dosée :

Méthode de Tallqvist.....	14	15,6
— Gowers	14	15,6
— Sahli	13,5	13,5
— Hellige..	13,2	13,2
— Newcomer	14,6	14,7
— Wu	15,7	15,8

Méthodes ferrométriques

	en fer °/oo
Méthode Fontès-Thivolle.....	0,55
— molybdochrom.	0,57
— Bertrand	0,51
— Fleury-Marque.....	0,54
— Lasausse	0,53
— — modifié ...	0,54
— Denigès.....	0,58
— Drilhon....	0,56
— Wong-Servantie.....	0,57
— Leavell-Ellis	0,55
— Korenmann.....	0,51
— au phénylpyruvate ..	0,57

Sang d'homme normal

4e Echantillon

Nombre d'hématies	4.200.000
Hémoglobine (Tallqvist)	90 °/₀
Valeur globulaire	0,96

	Fer	Hb trouvé
Méthode Tallqvist		14,6 g
— Gowers		14,6
— Sahli		14,2
— Hellige		14,8
— Newcomer		14,8
— Wu		14,9
— Fontès-Thivolle	0,483	
— Au $Cr^2O^7K^2$	0,497	
— Bertrand	0,442	
— Fleury-Marque	0,478	
— Lasausse	0,477	
— — modifié	0,505	
— Denigès	0,475	
— Drilhon	0,497	
— Wong-Servantie	0,485	
— Leavell-Ellis	0,479	
— Korenmann	0,522	
— Au phénylpyruvate	0,487	

Sang humain

5e Echantillon : sang de femme

Nombre de globules	4.100.000
Hb	90 °/₀
Valeur globulaire	0,98

	Fer décelé	Hb trouvé	Hb calculé	
Méthode Tallqvist		14,64 g	263	293
— Gowers		14,67		
— Sahli		13.58		
— Hellige		13,24		
— Newcomer		13,93		
— Wu		14,74		

	Fer décelé	Hb trouvé	Hb calculé
Méthode Fontès-Thivolle	0,447		
— $Cr^2O^7K^2$.	0,443		
— Bertrand	0,409		
— Fleury Marque	0,443		
— Lasausse.....	0,419		
— — modifié .. .	0,437		
— Denigès.	0,408		
— Drilhon.....	0,461		
— Wong-Servantie.....	0,471		
— Leavell-Ellis	0,442		
— Korenmann.....	0,385		
— Stuckert.....	0,334		
— Au phénylpyruvate.	0,435		
— Reis et Chakmakjan.	0,32		

B) Sang animal. - Sang de lapin

Echantillons n° 1 et 2.

	Fer sanguin	Hb trouvé	Hb	Fe
Méthode Tallqvist		14,6 g	15,38	
— Gowers		14,8	15,27	
— Sahli		14,1	15,03	
— Hellige		13,4	14,8	
— Newcomer		14,4	14,95	
— Wu		14,5	15,22	
— Fontès-Thivolle	0,437°/₀₀			0,434°/₀₀
— au $Cr^2O^7K^2$.....	0,433			0,431
— Bertrand.....	0,412			0,420
— Fleury-Marque	0,435			0,436
— Lasausse	0,428			0,434
— — modifié.....	0,435			0,429
— Drilhon.....	0,427			0,426
— Wong Servantie.....	0,428			0,425
— Butenschoen	0,395			0,365
— Reis et Chakmakjan ..	0,381			0,370
— Stuckert	0,375			0,340
— Leavell-Ellis.....	0,439			0,433
— Korenmann	0,420			0,420
— au phénylpyruvate ..	0,441			0,432

C) Sang de mouton

Echantillons N^os 1, 2 et 3

	Sang 1		Sang 2		Sang 3	
	Fer	Hb	Fer	Hb	Fer	Hb
Methode Tallqvist		9,4 g		8,43		8,47
— Gowers		9,8		8,54		8,47
— Sahli		9,2		8,49		8,40
— Newcomer		9,7		8,48		8,53
— Wu		9,4		8,45		8,46
— Fontès-Thivolle	0,465		0,425		0,418	
— au $Cr^2O^7K^2$	0,461		0,427		0,415	
— Bertrand	0,455		0,423		0,413	
— Fleury-Marque	0,462		0,426		0,419	
— Lasausse	0,463		0,420		0,415	
— — modifié	0,461		0,423		0,417	
— Drilhon	0,456		0,422		0,414	
— Wong Servantie	0,454		0,427		0,413	
— Butenschoen	0,425		0,392		0,383	
— Reis et Chakmakjan	0,417		0,394		0,374	
— Stuckert	0,408		0,388		0,368	
— Leavell-Ellis	0,453		0,427		0,410	
— Korenman	0,440		0,418		0,408	
— au phénylpyruvate	0,469		0,422		0,414	

D) Sang de chien

Echantillons N^os 1, 2 et 3

	Sang 1		Sang 2		Sang 3	
	Fe	Hb	Fe	Hb	Fe	Hb
Méthode Tallqvist		13,55		13,55		13,78
— Gowers		13,76		13,73		13,92
— Sahli		12,48		12,24		12,51
— Newcomer		12,82		12,37		12,42
— Wu		13,34		12,89		12,83
			Fer sanguin			
Méthode Fontès-Thivolle	0,485		0,482		0,495	
— chromométrique	0,481		0,479		0,501	
— Bertrand	0,477		0,474		0,504	
— Fleury-Marque	0,484		0,484		0,498	
— Lasausse	0,480		0,479		0,492	
— — modifié	0,486		0,482		0,497	
— Drilhon	0,477		0,478		0,491	
— Wong-Servantie	0,474		0,472		0,488	
— Butenschoen	0,435		0,441		0,472	
— Reis et Chakmakjan	0,441		0,444		0,474	
— Stuckert	0,450		0,442		0,445	
— Leavell-Ellis	0,472		0,478		0,487	
— Korenmann	0,470		0,471		0,481	
— au phénylpyruvate	0,482		0,477		0,490	

Ainsi donc, de ces résultats, nous déduisons les conclusions suivantes :

a) Nos résultats concordent avec les recherches antérieures. Au sujet du taux de fer sanguin, les chiffres trouvés ont peu varié selon les auteurs. Berzélius par ses méthodes, qui n'avaient de loin la précision de celles d'aujourd'hui, avait trouvé une moyenne de 0.39 gr. de fer par litre. Helmer et Emerson (67) estiment que le fer se trouve dans le sang dans la proportion de 0.49 gr. °/₀₀ à 0.57 gr. °/₀₀ chez l'homme, et 0.42 à 0.49°/₀₀ chez la femme.

Zizine par sa méthode à l'alloxanthine a trouvé des chiffres variant de 0.48 gr. à 0 57 gr. Ferville, à l'aide de la méthode de Wong, trouva des résultats sensiblement identiques sur des sujets normaux.

En ce qui concerne le taux d'hémoglobine sanguin, les opinions divergent :

d'après Fabre, le taux oscillerait autour de 13,5 gr. % ; d'après Haldane, le taux est de 13,8 ; pour Haden il s'élève à 15,6% ; enfin Williamson l'estime à 16,9 gr. Ce dernier chiffre nous semble trop élevé et estimons plutôt qu'il doit se rapprocher de 15 %.

La méthode de Fontès et Thivolle nous semble être la méthode ferrométrique de référence. Sans doute, la trouvons-nous longue et délicate ; elle nécessite un appareillage assez compliqué.

On pourrait encore classer comme procédé de référence la méthode de Fleury et Marque, qui tout en nous donnant en général des résultats un peu plus élevés que la précédente, exige beaucoup moins de matériel ; quant à la précision, elle est bien une méthode de choix Elle est essentiellement recommandable pour les dosages précis et minutieux. Nous la préférons à la méthode de Bertrand qui nous a régulièrement donné des résultats moins élevés, peut être dûs aux pertes que peut causer une calcination de 5 gr. de sang, où a ce que la réduction par le zinc est insuffisante.

Les méthodes colorimétriques sont indiquées, à notre avis, pour la recherche du fer et sa détermination clinique, ou pour sa recherche dans des matières organiques ; chaque fois qu'on veut éviter une calcination, la méthode de Wong s'impose ; les méthodes colorimétriques rejoignent ainsi les méthodes de détection histochimique. Elles ont l'avantage d'une plus grande simplicité, et nécessitent un matériel peu abondant ; les deux les meilleures sont celle de Wong Servantie, et celle de Leavell Ellis ; on peut encore recommander celle de Drilhon ; quant aux autres, y compris la méthode de Lapicque, il convient de s'en défier, ou du moins de ne s'en servir qu'avec prudence.

En ce qui concerne les méthodes hémoglobinimétriques, il est difficile de les juger en elles-mêmes, vu l'absence des procédés de référence. Par comparaison avec les résultats donnés par la teneur en fer et en multipliant par le coefficient 263 préconisé par Fleury, ou le coefficient 292 de Ferville (qui admet que dans 1 gr. H*b* il y a 0,0034 gr. de fer métallique), on trouve avec les méthodes dont nous nous sommes servies des chiffres plus élevés. D'ailleurs ces diverses méthodes nous ont donné pour H*b* des résultats peu différents, nous n'avons pas trouvé pour celles de Tallqvist ou Gowers des erreurs de plus de 10%

Le plus exact, le plus rationnel des procédés essayés, nous a paru sans conteste être celui de Wu qui est basé non plus sur une simple intensité de coloration, mais bien sur le pouvoir péroxydasique de l'hémoglobine.

b) Les méthodes que nous proposons se sont révélées satisfaisantes par rapport aux autres :

1) La méthode molybdochromométrique nous a donné des résultats voisins de ceux obtenus avec la méthode molybdomanganimétrique ; cette dernière est plus simple, mais nous pensons que la nôtre peut rendre des services en raison de la stabilité des liqueurs titrées.

2) La méthode iodométrique que nous proposons n'a aucun caractère d'innovation : nous pensons seulement être arrivés à adapter la méthode de Lasausse à n'importe quelles conditions de concentration.

3) La méthode au phénylpyruvate de soude et d'ammonium s'est montrée aussi fidèle que les autres méthodes colorimétriques. Elle nécessite une faible quantité de réactif, l'intensité de la coloration est bien proportionnelle aux intensités de concentration respectives. Elle nous semble utile surtout dans la recherche du fer, qui doit se trouver à l'état de traces infimes dans certaines matières organiques ; la réaction à l'acide (coloration verte) servira à la recherche, et on pourra employer la méthode en milieu ammoniacal pour son dosage ultérieur.

d) Que pouvons-nous conclure, en ce qui concerne les rapports qui lient le fer à l'hémoglobine ?

Ces résultats, de même que ceux trouvés par les auteurs qui nous ont précédé, ne nous permettent pas encore de fixer définitivement une constante qui exprime un rapport quantitatif entre les deux éléments. Les résultats obtenus ne sont d'ailleurs pas concordants.

D'après Barral[2], on trouve des chiffres allant de 0.30 à 0.40% ; d'après Ferville il y aurait 0.34% de fer dans l'hémoglobine. A notre tour nous avons essayé de doser le fer de H*b* en nous servant pour sa préparation de la méthode de Polonovski[17]; pour son dosage nous avons choisi la méthode de Fleury et Marque.

Nous avons trouvé les résultats suivants :

Prise d'essai n° 1	—	0.318%
2		0 329
3		0.312
4		0.322
5		0.324
moyenne		0.323

Le coefficient à appliquer serait de 309 ; en multipliant la teneur en fer par le chiffre 309, on n'aboutit pas encore aux chiffres donnés pour l'hémoglobine. Comment s'expliquer cette divergence de résultats, faible dans le sang normal, très important, comme l'a démontré Ferville, à propos du sang anémique ?

La première raison de cette divergence nous apparaît dans le désaccord des auteurs, au sujet de la teneur normale du sang en H*b* ; celle-ci est essentiellement variable. Le sexe, l'âge et le moment même de la journée influent sur sa concentration. Osgood[1] a bien montré, de même que Wintrobe[2] et Haden[3], que le sang de l'homme en renfermait une plus forte quantité que celui de la femme ; d'autre part, après l'âge de 60 ans, cette teneur diminue ; enfin Rabinovitch[4] a pu observer, pour une même personne, une variation de 26 % en un seul jour. Or, les échelles hémoglobinimétriques de Tallqvist et des autres auteurs sont construites en se servant comme étalon de la couleur que présente l'H*b*, ou ses dérivés, chez l'homme à l'état normal, comme s'il s'agissait là d'une constante. Mais il n'en est rien, et une méthode hémoglobinimétrique ne sera exacte que lorsqu'elle sera libérée de cette cause d'erreur.

D'autres méthodes ont été basées sur les colorations données par l'H*b* elle-même, et ces couleurs ont été fixées sur des verres, pour une raison de plus grande stabilité ; nous y constatons une amélioration des résultats, mais on ne doit pas confondre la couleur de l'H*b* isolée avec celle de H*b* répartie dans le plasma sanguin. L'idéal, en définitive, pour obvier à toutes ces causes d'erreurs, serait de doser H*b*O^2 après l'avoir préalablement extraite et isolée. Comme la technique en est longue et délicate, il suffira, à notre avis, d'effectuer des dosages de fer. Ce seront les seuls qui permettront de déterminer le taux de la

(1) Osgood : Arch. Int. Med. XXXIX p. 643-855 - 1927.
(2) Wintrobe : Arch. Int. Med. VL p. 287-301 - 1930.
(3) Haden : Jour. Am. Med. Ass. T. 79 p. 1496 - 1929.
(4) Rabinovitch : Voir thèse de Ferville (9) page 17.

déficience en H*b* et si la valeur globulaire renseigne sur la nature des anémies, le chiffre de l'H*b* doit toujours être confronté avec le chiffre donné par le fer sanguin, et même être remplacé par lui.

Une seconde raison de la divergence des résultats, dans certains cas, semble être une variation de la constitution même de l'hémoglobine. Les divergences sont telles que dans les cas d'anémie pernicieuse, nous ne pouvons, à notre avis, les expliquer seulement par des erreurs expérimentales, un mauvais choix de constante ou un mauvais étalonnage d'appareil. L'anémie est-elle due simplement à une diminution du taux de H*b*, ou plutôt à une diminution du métabolisme du fer, à un affaiblissement de la fixation d'oxygène? Les auteurs ont constaté dans cette affection une formation anormale de méthhémoglobine, et de produits de désagrégation de H*b*; ne sont-ce pas ces produits qui causent les erreurs observées ?

La moindre activité observée de H*b* au cours de la vieillesse semblerait nous faire admettre un changement avec l'âge dans la constitution de l'H*b*.

Nous n'émettrons la-dessus que des hypotèses ; il est certain d'une part que le pouvoir peroxydasique est plus limité, et que la réaction d'oxydo-réduction est moins énergique ; serait-ce dû a un départ partiel de glutathion ? Dans des recherches ultérieures, nous nous proposerons d'élucider ce problème.

Quoi qu'il en soit, en résumé, la supériorité des méthodes ferrométriques s'impose, et dans tous les cas cliniques graves, un dosage de H*b* devra nécessairement être complété par un dosage ferrométrique.

3e série de recherches

Dosage du fer et de Hb dans les cas pathologiques

Nous n'avons pas l'intention de poursuivre les recherches de Ferville remarquables à la fois par la sûreté de leur technique et leur précision, à propos des cas d'anémie. Etant en

possession de plusieurs méthodes précises de dosage, nous nous sommes demandé si les déficiences mentales, les désordres d'ordre sérologiques provoqués par les lésions bacillaires pouvaient avoir une influence sur le rapport entre le fer sanguin et l'hémoglobine. Nous nous sommes adressés à de nombreuses catégories de malades, la plupart chroniques et pratiquement incurables. Nous avons pratiqué chez chacun une prise de sang, à l'aide de laquelle nous avons évalué la valeur globulaire et le taux du fer sanguin ; nous avons noté en outre les signes, lésions ou désordres intraorganiques qui pouvaient restreindre ou augmenter ces relations.

Notre technique rejoint celle de Ferville, mais nous indiquons aussi la valeur globulaire.

Cas N° 1

Métis. - Réaction de BW +++ P.G

Caractéristiques

Hématies	4.712.000 au mm3
H*b* (méth. Gowers)	90 %
— — Wu)	15.7
Valeur globulaire	0 88
Fer sanguin	0 505 g

Cas N° 2

Impaludé en accès de fièvre.

Hématies	5.125.000 au mm3
H*b* (méth Gowers)	90 %
— — Wu)	16.3
Valeur globulaire	1.04
Fer sanguin	0.512 g

Cas N° 3

Paludéen en voie de réfection. Hématozoaires invisibles, absence de corps en rosace. Hématoblastes nombreux.

Hématies	3 980 000
Taux de H*b* (Gowers)	70 %
— — (Wu)	14.40 g
Valeur globulaire	0.81
Fer sanguin	0 453 g

Cas N° 4

Malade P. G. souffrant de dépression catatonique. Réaction de B. W. positive. Nourri constamment à la sonde avec du lait.

Hématies	3.225.000
Taux de H*b* (Goewrs)	70 %
— — (Wu)	11.85
Valeur globulaire	0.97
Fer sanguin	0.37 °/₀₀

Cas N° 5

Dépression mélancolique. Réaction de B. W. négative.

Hématies	3.750.000
Taux de H*b* (Gowers)	80 %
— — (Wu)	12.95
Valeur globulaire	0.96
Fer sanguin	0.44 g

Cas N° 6

Démence précoce catatonique.

Hématies	4.225.000
Taux de H*b* (Gowers)	90 %
— — (Wu)	13 37
Valeur globulaire	0.926
Fer sanguin	0 483

Cas N° 7

Démence précoce. Paranoïaque.

Hématies	4.500.000
Taux de H*b* (Gowers)	100 %
— — (Wu)	13.6 g
Valeur globulaire	1
Fer sanguin	0.52

Il ne nous a pas semblé nécessaire de poursuivre plus loin l'énoncé de nos résultats concernant ces examens, car ils ne feraient que confirmer les faits suivants : d'abord la nécessité de doser à part l'H*b* et le fer sanguin, puis l'absence de relation constante et nécessaire entre le fer et l'H*b*, cela en raison de ce que le dosage de H*b* n'est pas encore au point. En règle générale, les chiffres en H*b* trouvés sont d'une valeur supérieure à ceux du fer sanguin. Or, par l'étude du sang de malades atteints d'aliénation mentale, nous n'avons trouvé aucune différence de comportement avec le sang des hommes normaux.

Alors que chez les aliénés, diverses constantes de teneur en albumine varient, il n'en est pas de même pour l'H*b*. Celle-ci conserve les mêmes propriétés et semble garder la même formule. Des découvertes récentes ont montré que lors de la paralysie générale la teneur en acides aminés du sang et du liquide céphalorachidien était modifiée, notamment la teneur en tryptophane s'y élève de façon très anormale; nous pouvons affirmer que ces acides aminés ne se forment pas aux dépens de l'hémoglobine qui reste intacte et constante.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

L'étude de l'hémoglobine, et même simplement son dosage, posent, ainsi que nous l'avons montré dans ce travail, de nombreux et complexes problèmes d'ordre à la fois technique, chimique et biologique. Il ne nous a malheureusement été possible, au cours de nos recherches, d'en aborder qu'un nombre restreint et nous nous proposons de continuer ultérieurement cette intéressante étude.

Dans la première partie de ce travail, nous avons rassemblé et résumé l'état actuel des connaissances acquises sur la constitution de l'hémoglobine, espérant par là faciliter les recherches sur son dosage précis, puis sur sa genèse, son évolution et sa dégradation.

Nous avons ensuite examiné les principales méthodes qui ont été préconisées pour le dosage de la matière colorante du sang titrée en tant qu'hémoglobine. Dans les ouvrages médicaux, les auteurs, en particulier Agasse-Lafont (1), recommandent ces techniques que nous pouvons appeler hémoglobinimétriques : les causes d'erreur sont jugées de moindre valeur et de moindre importance que dans les méthodes dites « chimiques ». Parmi ces méthodes, nous n'avons trouvé aucun procédé qui réponde à la définition d'un procédé de référence et prescrit un réel caractère d'absolu, et la totalité des auteurs qui ont décrit un hémomètre s'était basée pour son étalonnage sur l'une quelconque des méthodes chimiques. Pourquoi cette lacune ? La raison nous en semble être qu'on n'a pas encore réussi à isoler, sans la désintégrer partiellement, l'hémoglobine, qu'il faudrait logi-

quement avant de la titrer séparer des autres constituants des hématies.

A défaut de procédé de référence hémoglobinimétrique, existe-t-il au moins des méthodes de ce type concordant avec d'autres, basées sur des propriétés particulières de H*b*, ou le dosage de l'un de ses éléments constitutifs ? D'une manière générale, nous avons toujours trouvé des résultats plus élevés avec H*b* ; il est en outre à remarquer que le pouvoir colorant de H*b* n'est pas constant, car il y a dans le sang un élément perturbateur, les albumines du stroma. On a constaté aussi que dans les cas de lipémie, les erreurs dans le dosage de l'hémoglobine peuvent être très élevées. Un dosage rationnel de H*b* exige-t il une séparation préalable du sérum sanguin et des albumines du stroma ? Nous avons effectué des dosages sur du sang dilué, sur du sang centrifugé préalablement, et dont le sérum a été remplacé par une solution de *NaCl* physiologique, et aussi sur du sang egalement centrifugé, dont les globules restants ont été avant addition de sérum physiologique, lavés à l'éther, puis débarrassés de ce solvant qui aura entraîné une partie des lipides et des albumines du stroma. D'après la méthode de Newcomer, nous avons trouvé les résultats suivants :

	H*b* %		
Sang dilué	15,2	14,2	12,5
— centrifugé	15,5	14,7	12,9
— — et lavé à l'éther.	15,7	14,9	13,0

Telle est la seule amélioration que nous proposons actuellement d'apporter au dosage hémoglobinimétrique et sur laquelle nous nous proposons de revenir au cours de recherches ultérieures.

La meilleure méthode de dosage hémoglobinimétrique nous a paru être celle de Wu qui utilise le pouvoir peroxydasique de ce pigment tétrapyrrollique.

Les méthodes ferrométriques, très nombreuses, nous ont

paru présenter un très grand intérêt surtout au point de vue de la recherche scientifique. Nous n'avons pu les étudier toutes et nous nous sommes limités aux plus employées. Quoique basées sur des principes parfois très différents, toutes utilisent trois opérations analogues :

I) l'extraction du fer sanguin.

II) la transformation de ce fer en une combinaison se prêtant au dosage.

III) le titrage proprement dit.

1) *L'extraction du fer*

Pour réaliser cette opération on dispose de deux techniques différentes : l'extraction à partir des cendres, à la suite d'une calcination, ou l'extraction à partir d'un filtrat obtenu par défécation. La grosse majorité des méthodes utilisent l'élimination de la matière organique et par voie de conséquence la minéralisation du fer. On opère soit dans un matras de Kjeldahl, soit dans une capsule de platine ou de porcelaire. Les agents oxydants, destinés à faciliter l'incinération et la calcination qui ont été proposées, ont été l'acide perchlorique, l'acide nitrique, l'acide persulfurique, ou leurs sels de potassium, d'ammonium ou de magnésium, en présence de SO^4H^2. Le procédé de minéralisation le plus élégant nous semble être celui de Paulais (102) qui se sert de l'action combinée de ClO^4H, NO^3H et SO^5H^2 en présence de SO^4H^2 ; nous avons eu également de bons résultats avec NO^3NH^4 qui est ensuite détruit au cours de la calcination et ne gêne pas la suite des réactions.

La défécation, que nous avons essayée sans succès et appliquée à quelques méthodes ferrométriques, ne convient que pour la méthode de Wong, ainsi que pour celle de Leavell-Ellis. Pour que la minéralisation soit complète, la durée du contact de H*b* avec le persulfate de potassium doit être de six heures environ.

2) *Passage du fer à un état sous lequel il est aisément dosable*

Le fer de l'hémoglobine est transformé soit en sel ferreux, soit en sel ferrique, soit en un complexe. Les meilleurs agents réducteurs pour le transformer en sel de fer nous ont paru le mercure et l'oxydule de cuivre; les meilleurs agents oxydants pour le transformer en sel ferrique ont été le peroxyde d'hydrogène à 20% et l'acide nitrique. Comme les sels ferreux jouissent de propriétés réductrices plus prononcées que ne le sont les propriétés oxydantes des sels ferriques, nous avons effectué de préférence le dosage du fer à l'état ferreux.

Quant aux complexes utilisables, la plupart se forment aisément et la couleur se développe en quelques minutes

3) *Titrage du fer*

Il se fait soit par titrimétrie, soit par colorimétrie.

A la suite de nos recherches, nous sommes arrivés aux conclusions suivantes :

a) Toutes les méthodes ferrométriques de dosage H*b* sont très délicates, mais comme elles portent sur un élément minéral, quelques unes d'entre elles sont d'une haute précision. La plus précise et la plus exacte, que nous avons choisie comme procédé de référence, est celle de Fontès et Thivolle. Nous avons obtenus des résultats presque aussi rigoureux avec celle de Fleury et Marque; ces deux méthodes sont de beaucoup supérieures à tous les autres procédés titrimétriques. Les méthodes molybdomanganimétriques, pour les recherches purement scientifiques, présentent de l'intérêt plutôt que pour les recherches cliniques.

b) Les méthodes colorimétriques sont de valeur très inégale; nous avons déterminé, pour quelques unes d'entre elles, celles qui sont considérées par les auteurs comme les meilleu-

res, leur degré de sensibilité, et étudié le développement des colorations en fonction de la concentration. Les plus exactes nous ont semblé être celles de Wong-Servantie et de Leavell-Ellis. Ces dernières méthodes conviennent au dosage en série, et par suite aux recherches cliniques.

En résumé, nos recherches nous ont permis de classer les méthodes étudiées par nous dans l'ordre suivant :

A. - Méthodes titrimétriques.

a) Fontès-Thivolle. - Avantages : dose le fer seul, isolé de tout autre élément minéral ; le dosage n'est pas influencé par des impuretés résultant de cendres dissoutes.

Sensibilité : exige une prise de sang minimum de 0,25 cc soit 0 mg 125 environ de fer.

Méthode de recherche scientifique.

b) Fleury-Marque. Moins délicate, elle est sensible à partir de 0.5 mg. de fer pour 1 cc. de sang.

c) Méthode Lasausse. Sa technique est plus simple, mais sa précision inférieure ; elle comporte des erreurs de 4%, et ne peut s'employer que dans les strictes conditions indiquées par l'auteur. Afin d'élargir ses possibilités d'utilisation, nous avons proposé une légère modification, qui rend en toutes conditions, à la température de laboratoire, la réaction irréversible.

B. - Méthodes colorimétriques

La méthode de Denigès donne des résultats exacts à partir de la concentration de 0,5‰, mais pour son appréciation, la teinte jaune est relativement peu sensible à l'œil ; celles de Korenmann, de Rosanov, quoique bien plus sensibles, ont l'inconvénient de présenter la même difficulté d'appréciation d'égalité des teintes.

Aussi préférons-nous de beaucoup les méthodes de Wong-Servantie, et de Leavell-Ellis, sensibles dès la concentration de 0.05°/₀₀, et présentant l'avantage d'obéir à la loi de Beer-Lambert.

Nous nous sommes proposé ensuite, de rechercher une méthode chromométrique applicable à la chimie biologique, et à la clinique, qui nous a donné des résultats dans des conditions déterminées et que nous estimons susceptibles de rendre service à côté des méthodes habituelles molybdomanganimétriques.

Enfin sur les conseils de M. le professeur Cordier, nous avons essayé de mettre au point une méthode colorimétrique de dosage de sels de fer au moyen du phénylpyruvate de sodium.

Il nous est nécessaire d'établir au préalable pour ce réactif, une courbe colorimétrique d'étalonnage, car la coloration verte, due à l'action du fer sur l'acide cétonique, subissant la réaction d'énolisation, n'obéit pas pour toutes les concentrations à la loi de Beer-Lambert. Nous avons obtenu par contre de meilleurs résultats, en ajoutant après l'addition de perchlorure de fer, une petite quantité d'ammoniaque: il se produit alors une coloration rouge dont l'intensité est fonction de la concentration en fer de la solution Nous avons précisé les conditions d'emploi de la méthode, et recommandons en particulier de n'ajouter l'ammoniaque que deux minutes après que la couleur verte a commencé à se développer, car c'est dans ces conditions que la coloration atteint son intensité maxima pour une concentration donnée.

Ainsi d'ailleurs que d'autres auteurs avant nous, nous avons constaté que les résultats en *Hb* donnés par les méthodes hémoglobinimétriques et les méthodes ferrométriques, ne concordaient pas, et nous avons indiqué les raisons qui semblent expliquer ces différences ; nous nous demandons en outre si ce désaccord ne serait pas dû à la présence dans l'organisme

humain de plusieurs hémoglobines. Haurovitz[1] en a effectivement décelé 4, dont deux présentes simultanément chez l'adulte ; les deux autres sont celles du fœtus et celle de l'anémie pernicieuse ; cette dernière est plus colorée que les autres quoique renfermant relativement moins de fer. Les 3 autres hémoglobines jouissent de propriétés à peu près semblables en ce qui concerne leur teneur en fer, en acides aminés, en soufre, et leur spectre à l'ultraviolet ; on pourrait ainsi expliquer par une telle différence de constitution du pigment les anomalies observées en analyse. Les 4 hémoglobines diffèrent beaucoup d'entre elles par leur affinité pour l'oxygène, quoique leur capacité d'absorption de ce gaz soit identique. Il en résulte qu'un dosage rigoureux de H*b*, en plus de la détermination du fer sanguin, devrait comporter une détermination de l'affinité pour O_2, que l'on pourrait mesurer par la détermination de la pression par laquelle le pigment cède le gaz.

Certaines H*b* le cèdent facilement (celles des animaux inférieurs) ; celle de l'homme adulte a une affinité moins grande que celle du fœtus, ce qui explique que même si la mère a un système circulatoire de mauvais fonctionnement, le fœtus conserve la possibilité de disposer intégralement de l'oxygène dont il a besoin.

L'étude de l'affinité du sang pour l'oxygène se raménerait au dosage de l'hémoglobine physiologiquement active dans l'organisme, et c'est cette hémoglobine qui à notre avis, est la plus intéressante et la plus importante à déterminer. Aussi avons-nous l'intention, dans des recherches ultérieures, d'effectuer de telles déterminatives qui doivent être pratiquées en même temps que les titrages ferrométriques, et nous semblent destinées à nous fournir les indications les plus précieuses sur le métabolisme du fer.

(1) Haurovitz : Zeitschrift. Physiol. Chem. 1935 T. 232 p. 125.

TABLE DES MATIÈRES

PAGES

INTRODUCTION 17

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE I. — Etude de la constitution et du rôle de l'hémoglobine 23

CHAPITRE II — Méthodes de dosage de l'hémoglobine Généralités et classification 45

CHAPITRE III. — Descriptions des méthodes utilisées 52

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE I. — Problème de la méthode de référence 71

CHAPITRE II. — Comparaison et critique technique des méthodes ferrométriques 77

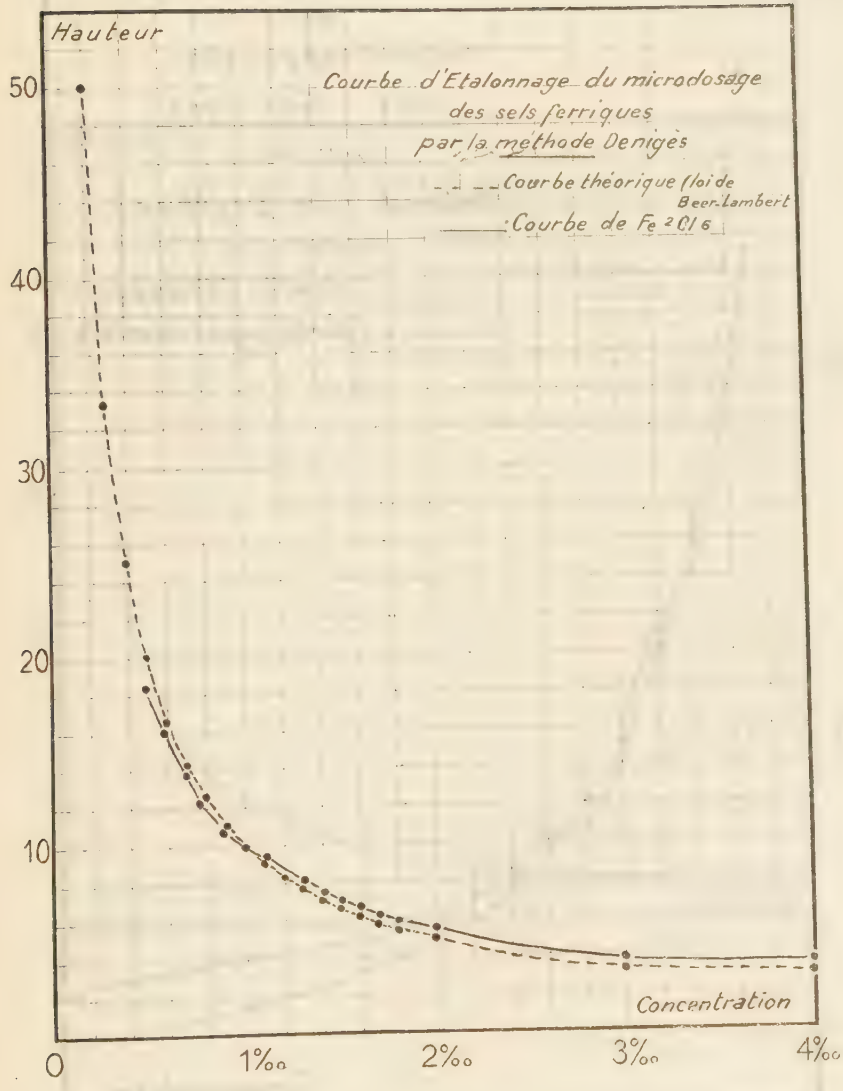
CHAPITRE III. — Méthodes nouvelles 97

1) Méthode molybdochromométrique 97

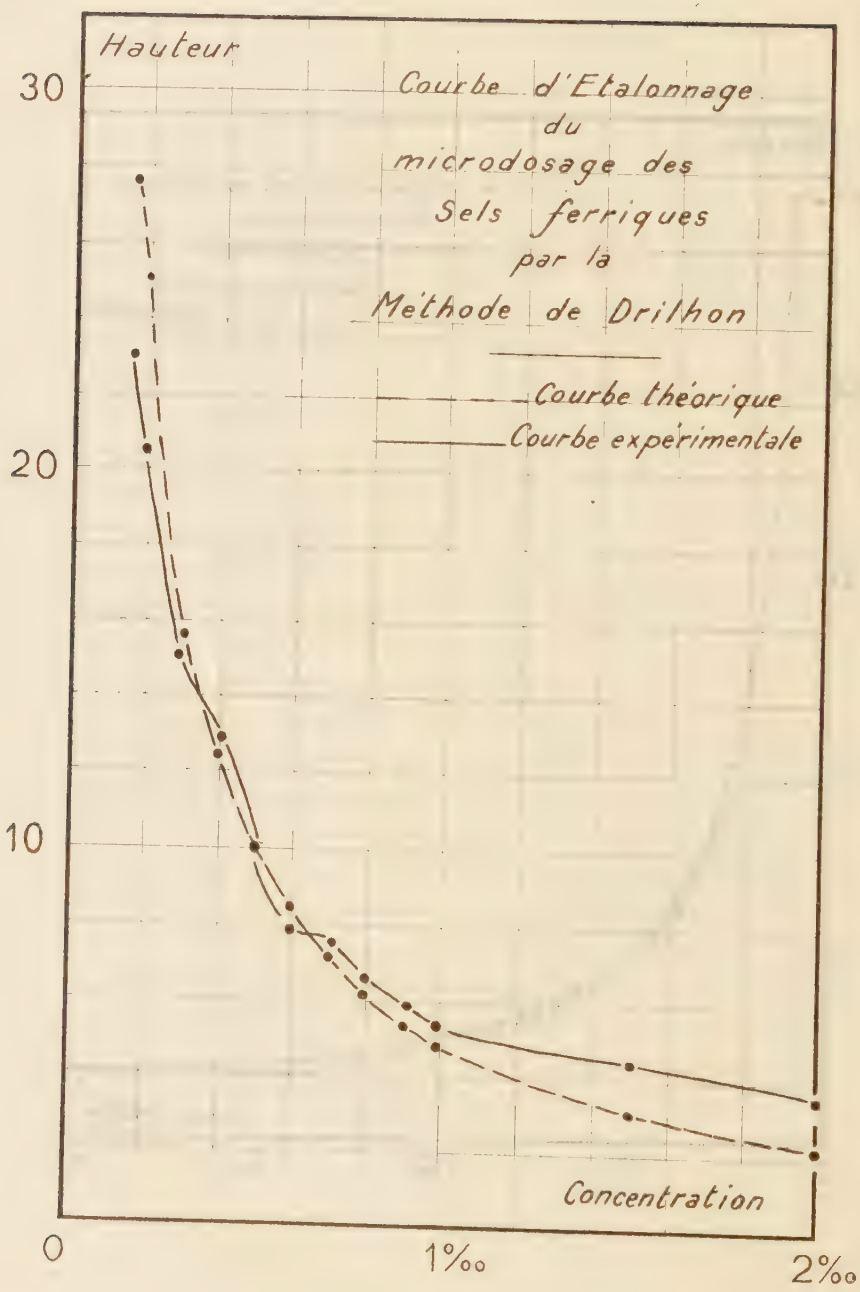
2) Méthode colorimétrique à l'acide phénylpyruvique 103

CHAPITRE IV. — Etude comparée et simultanée des méthodes ferrométriques et hémoglobinimétriques 111

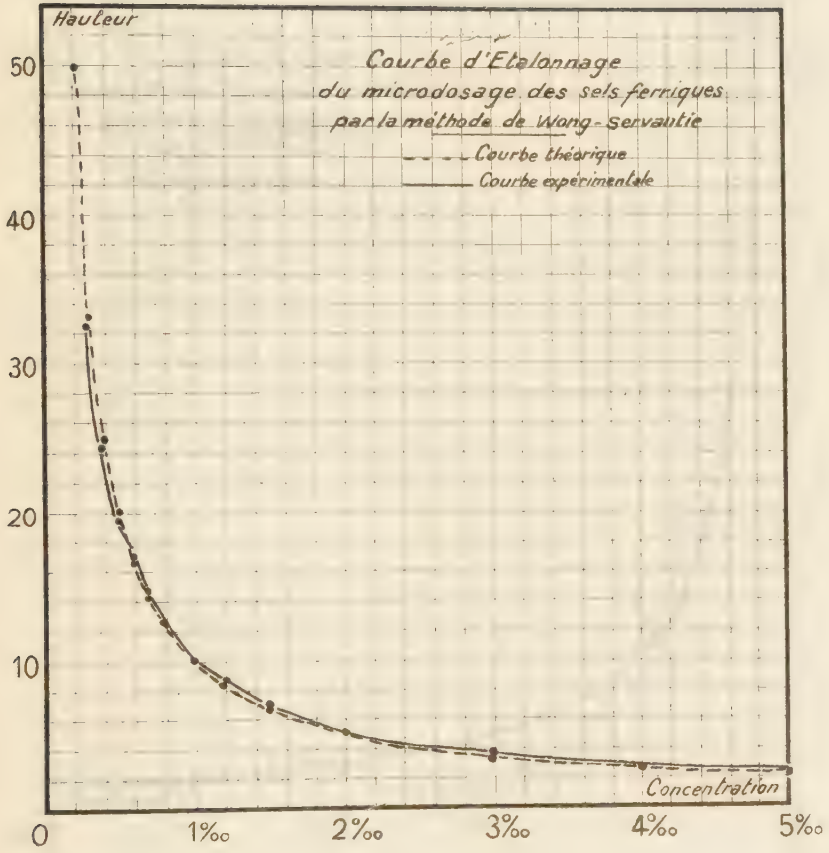
CONCLUSIONS GÉNÉRALES. 127


Hauteur
Courbe d'Etalonnage du microdosage
des sels ferriques
par la méthode Denigès
Courbe théorique (loi de
Beer-Lambert
Courbe de Fe2Cl6
50
40
30
20
10
0
1‰
2‰
3‰
4‰
Concentration

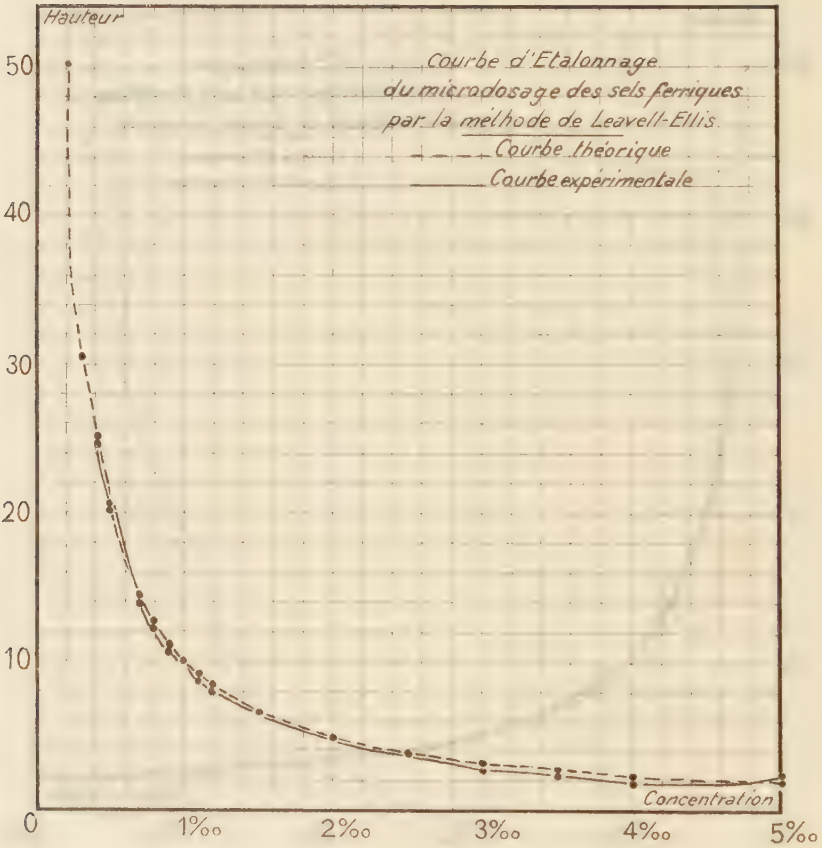
II

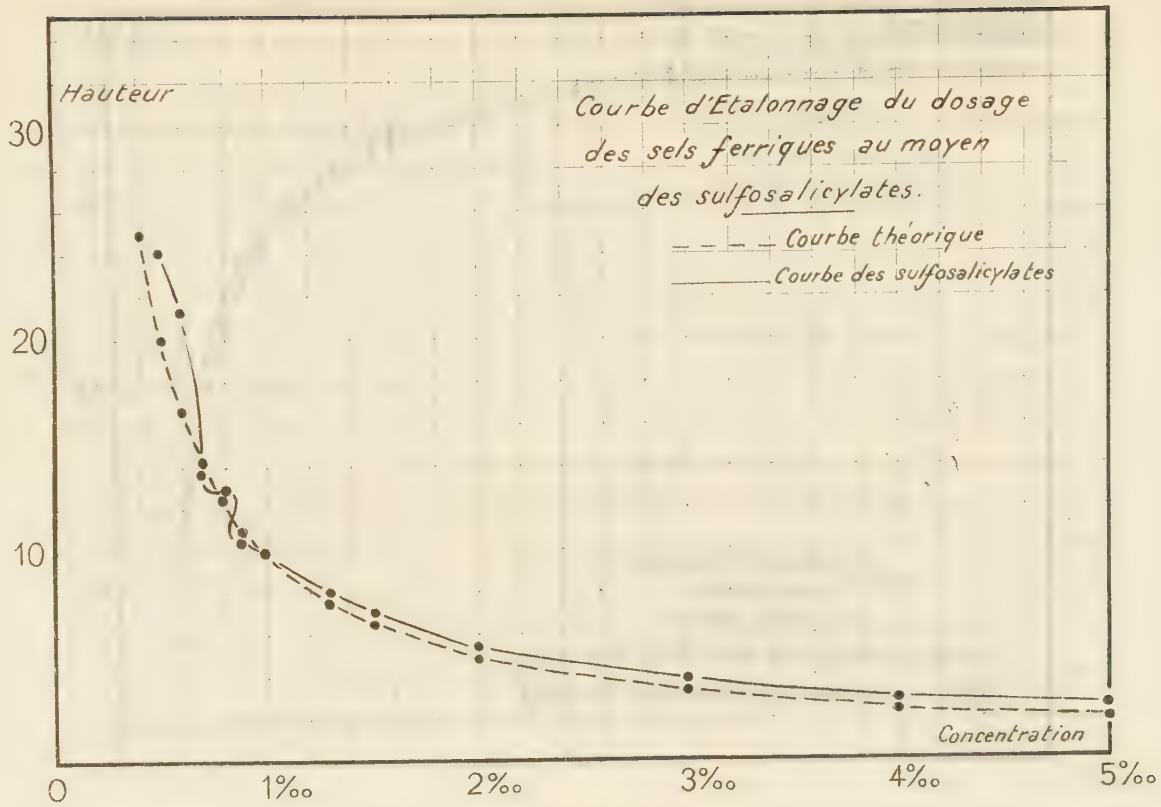

Hauteur
30
20
10
0
Courbe d'Etalonnage
du
microdosage des
Sels ferriques
par la
Méthode de Drilhon
Courbe théorique
Courbe expérimentale
Concentration
1‰
2‰

III

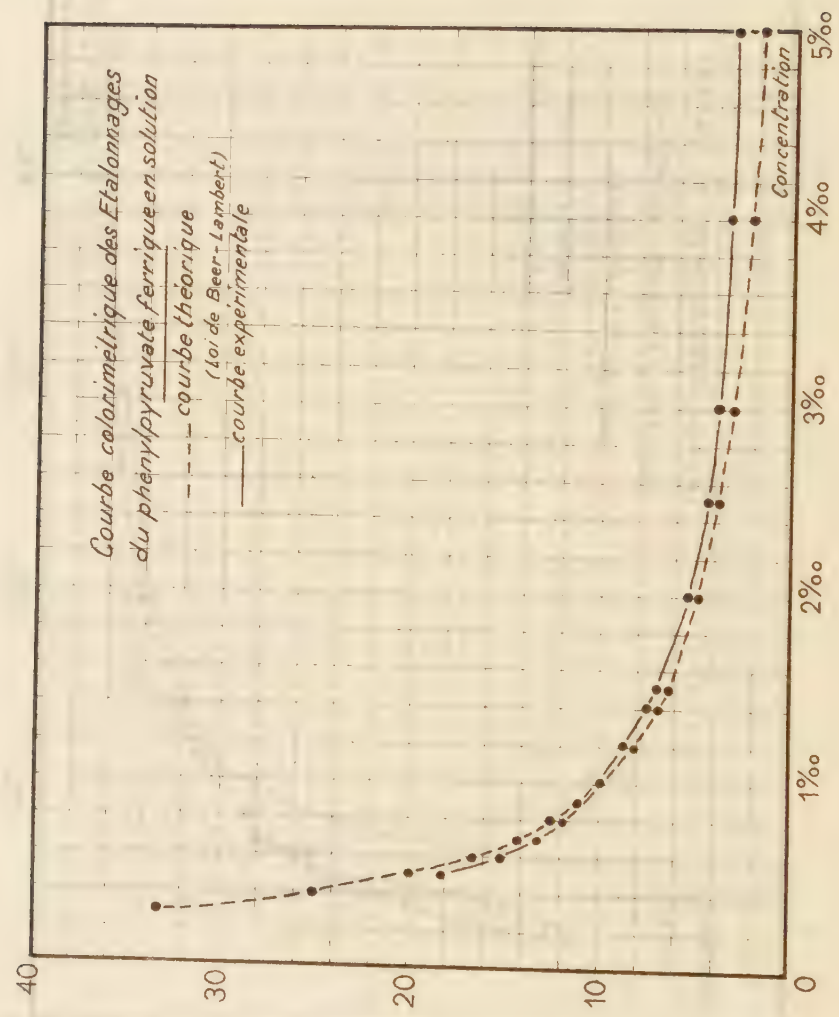

Hauteur
Courbe d'Etalonnage
du microdosage des sels ferriques
par la méthode de Wong-Servaitie
Courbe théorique
Courbe expérimentale
50
40
30
20
10
0
1‰
2‰
3‰
4‰
5‰
Concentration

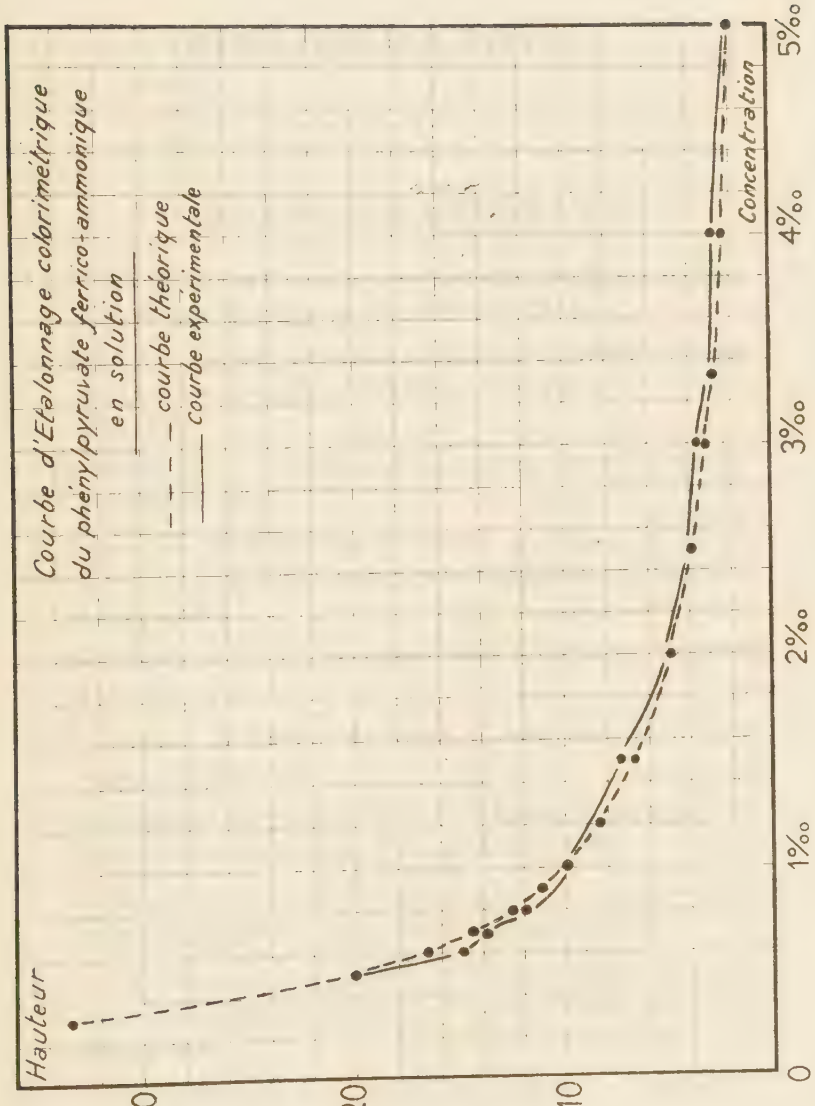
IV


Hauteur
50
40
30
20
10
0
Courbe d'Etalonnage
du microdosage des sels ferriques
par la méthode de Leavell-Ellis
Courbe théorique
Courbe expérimentale
Concentration
1‰
2‰
3‰
4‰
5‰


Hauteur
30
20
10
0
1‰
2‰
3‰
4‰
5‰
Concentration
Courbe d'Etalonnage du dosage des sels ferriques au moyen des sulfosalicylates.
Courbe théorique
Courbe des sulfosalicylates

V


Courbe colorimétrique des Etalonnages
du phénylpyruvate ferrique en solution
courbe théorique
(loi de Beer-Lambert)
courbe expérimentale
40
30
20
10
0
1‰
2‰
3‰
4‰
5‰
Concentration


Courbe d'Etalonnage colorimétrique
du phényl/pyruvate ferrico-ammonique
en solution
courbe théorique
courbe expérimentale
Hauteur
30
20
10
0
1‰
2‰
3‰
4‰
5‰
Concentration

BIBLIOGRAPHIE

I. - OUVRAGES GÉNÉRAUX

1. E. Agasse-Lafont. — Les applications pratiques du laboratoire à la clinique, p. 270 et 279 (1937).

2 Barral. — Précis d'analyse biologique clinique. — Sang. — (Cite les méthodes de Jolles et Moreau). Ed J.-B. Baillère 1931.

3 Bertrand G. — Guide pour les manipulations de chimie biologique. 1913, p. 32.

4. Bicart. — Contribution à l'étude de l'hémoglobine au cours des anémies pathologiques et expérimentales. Strasbourg 1929.

5. Cristol C. — Précis de chimie biologique médicale. Masson 1937.

6 G. Denigès, L. Chelle, A. Labat. — Précis de chimie analytique. Paris 1931.

7. Dictionnaire encyclopédique des Sciences Médicales. — 4° Série, tome 13; article : Hémoglobine 1886.

8 P. Ducou. — Considérations sur la methhémoglobine. Son dosage dans le sang. Thèse méd. Paris 1925.

9. J. J. E. Ferville. — Dosage de l'hémoglobine dans les anémies expérimentales et cliniques. Thèse méd. Bordeaux 1935.

10. N. Fiessenger, H R. Olivier, M. Herbain — Diagnostics biologiques. Ed. Maloine. Paris 1938.

11. P. Fleury et J. Marque. — Fiches techniques de chimie biologique 1934. — Fiche : le sang N° 6.

12. E. Gley. — Traité élémentaire de physiologie. Tome I.

13. J. Guiart et Grimbert. — Précis de diagnostic. 4 Ed. 1922. Cite les méthodes de Leclère-Tallqvist-Hayem et Malassez.

14. A. Guy. — Pratiques médico-chirurgicales. Tome 7. 3e Edit. P. 890. Ed. Masson 1931. Titre : le sang, dosage de l'hémoglobine et valeur globulaire.

15 Lapicque. — Thèse Méd. Paris 1897.

16. Lavoisier. — Traité élémentaire de Chimie présenté dans un ordre nouveau et d'après les découvertes modernes. 2 Edit. Tome I. Page 130. 1781.

17. — M. Polonovski et A. Lespagnol. — Eléments de chimie organique biologique. Ed. Masson. Paris 1934.

17 *bis*. — Raspail F. V. — Nouveau système de chimie organique. Paris Baillère. 1833.

18. Roger. — Traité de physiologie et de pathologie. Tome VI, art. de Fabre sur l'hémoglobine.

19. H. Sahli. — Diagnostic methods. Philadelphie 1905.

20. P. Zizine. — Le dosage du fer dans le sang et les organes. Thèse méd. Paris 1925.

II. - MONOGRAPHIES

21. Abderhalden et Moller. — Hoppeseylers Zeitsch. J. Physiol. Chem. 1928. T. 176, p. 95.

22. Acta scholoe médicinalis universitatis imperialis in Kioto. Vol. XX, fasc. III. 1937.

23. H. Astruc et A. Castel. — Ann. Chim. Analyt. 1935, p. 173.

24. Barcroft. — Journ. of Physiol. T. 39. P. 118 à 148 et 411 à 428. 1909.

25. Barcroft J. — Le groupement protéique dans l'hémoglobine. Bull Soc. Chim. Biol. X N° 2. page 279. 1928.

26. Barkan. — Hoppe Seylers Zeitschr. Physiol. Chem. 1928. T. 177, p. 208.

27. HH. Beard et Myers. — J. Biol. Chem. 1931. Vol. 92, N° 1 et vol. 94, N° 1, p. 71.

28. R. Berg et H. Kustenmacher. — Nouveaux réactifs spécifiques du fer. — Journ. Pharm. Chim. 1933, II, p. 399. (8e S. T. 18)

29. L. Berman. — Méthode rapide du dosage du fer dans de petites quantités de sang. — J. Biol. Chem. T. 35, p. 231. 1918.

30. F C. Bing et R. W. Baker. — Journ. Biol. Chem. 1931 (92), p. 589.

31. Blau. — Monatsheft, 1898, t. 19, p. 647.

32. A. L. Brown. — Journ Amer. Chem. Soc. (44), p. 423. 1922. — A new quantitative method for the determination of iron in the blood.

34 Burmeister. — Journ. of biol. chem. 1934 T. 105 n° 1 p. 189; Bull. sc. Pharmacol. 1935 p. 508.

35. Claissen. — Ber. XX p. 656 — 1887.

36. Le Canu, Prévost et Dumas. — Voir G. Murphy. Lynch. Howard Arch. — in. med. T. 47 p. 885.

37. Cohen et Smith. — The colorimetric determination of haemoglobin. A practical procedur : J. Biol. Chem. 1919 T. 39 p. 489

38. Damade, Servantie et Ferville. — Dosage de l'hémoglobine dans l'anémie expérimentale chez le lapin. C. R. Soc. Biol. de Bordeaux, séance du 11/12/35. C. R. Soc. Biol. 1936 T. I (L. 24) p. 229.

39. G. Denigès. — L'alloxanthine, réactif d'application très générale du ferricum. — C. R. Acad. Sc. du 9 février 1925.

40 G. Denigès. — Dosage rapide par colorimétrie de très faibles quantités de fer. — Applications au sang. Bull. Soc. Pharm Bordeaux 1929. T. 67 n° 2, P. 81.

41. A. Dreyfuss et Mlle Jacob — Méthode simple et précise du dosage de l'hémoglobine. — Séance Sté fr. d'Hémothologie du 5/XI/37. — Presse médicale 1937 p. 1782.

42 M. Drilhon. — Microdosage du fer dans le sang et les liquides biologiques C. R. Soc Biol. 1932 t. 109 n° 14 p. 1234. Ann. Chim. Analyt. 1933 p 113

43. Ch Dufraisse et R. Horclois. — Sur la catalyse d'autooxydation; actions antioxygènes ou prooxygènes du fer et de ses composés (1930) C. R. Acad. Sc. T. 191 n° 2 p. 1126.

44. C. A. Elvehjem. — Sur le dosage du fer dans le lait et autres milieux biologiques. — Journ. Biol chem. 1930 T. 86 p 463 — Journ Pharm. chim 1931 (8e S) T. 13 P 493.

45. C. A. Elvehjem et Shermann. — L'action du cuivre sur le métabolisme du fer. Journ. Biol. chem. 1932 (98) P. 309.

46. F. Feigl et H. Hamburg. — Zeitschr. Anal. Chem. 1931 T 86 P. 7 à 13 — Journ. Pharm. Chem. 1933 (8e S.) T. 17 p. 138.

47. F. Feigl, P. Krumholz, H. Hamburg. — Dosage colorimétrique du fer avec l'$\alpha\,\alpha'$ dipyridile. Journ Pharm. Chim. 1933 8e S. T. 20 P. 279.

48 D Felton. — A Substitute for acid hematin as the standard in Sahli's haemoglobinometer. — John Hopkins hosp. Bull. T. 34 p. 357.

49. A. V. Filosoffovo et S. Melnick — J. Prikl. Khim 1932 T. 5 p. 219 Ann Chim. Appl 1933 p. 32.

50. P. Fleury et J. Marque. — Bull Soc Chim. Biol. 1929 T 11 P. 1123 et 1925.

51. G. Fontès et L. Thivolle. — Bull. Soc. Ch Biol T. IV p. 614. — 1922.

52. G. Fontès et L. Thivolle. — La molybdomanganimétrie et ses applications. — Applications au dosage du fer dans le sang. — Bull Soc Chim. Biol V p. 325, 340, 782 - 1923.

53. G. Fontès et L. Thivolle. — Sur la teneur du sérum en fer non hémoglobinique et sur sa diminution au cours de l'anémie expérimentale. — C. R. Soc. Biol. T 93 p. 687 — 1925.

54. G. Fontès et L. Thivolle. — La réfection maxima de l'hémoglobine sanguine. — "Le sang". — T. 6 p. 658 1930.

55. G. Fontès et L. Thivolle. — C. R. Soc. Biol. 1931 T. 111 p 1190.

56 G. Fontès et L. Thivolle. — Sur le dosage exact de l'hémoglobine dans le sang normal et anémique. "Le sang" T. VI p. 207. — 1932.

57. W. R. Gowers. — Apparatus for the clinical estimation of the haemoglobin in the blood. Trans. Clin. Soc. London Lancet T II p. 882. — 1878

58. Grohe. — Virchow's Arch 1867 T 39 p 42.

59. R. L. Haden. The normal haemoglobin standard — Journ. amer. med ass. T 79 p 39 p. 1496 — 1922.

60. R. L. Haden. A new haemoglobinometer — Journ. Labor. and clin. med T 16 p. 68 et 72 — 1930

61. Haessler et H. Newcomer. — A new haemoglobinometer. Arch int. med. T 17 p. 806. — 1916.

62. J. Haldane. — The colorimetric determination of haemoglobin — J. Physiol. T 26 p. 497. — 1900.

63. J. Haldane et J. L. Smith. — J. physiol T 25 p. 331 1899.

64. Hallion et Borrien. — Revue prat de Biologie appliquée Mars 1934.

65. R. F. Hanzal. — Journ. Biol. Chem 1933 T. C. n° 3.

66. H. D. Haskins. — J. Biol. Chem. T. 57 p. 111. 1923.

67. Haswell — Dingl. Polyt. Journ. T. 240 p. 309. - 1906. Supplément du dictionnaire de Wurtz art. fer. p. 26. 1906.

67 *bis*. Helmer et Emerson. — Jour. of Biol. Chem. 1934 T. 104 n° 1 p. 157.

68. J. Henderson, Blackwood et Dempster. — Biochem J. 1933 T 26 p. 253.

69 Hénocque. — C.R. Soc. Biol. 1886 p. 493.

70. V. Henriquez et M. A. Roche. — Sur l'élimination du fer chez le chien. Bull. Soc. Ch. Biol. 1930 T. XII n° 3 p. 395.

71. — Bull. Soc. Ch. Biol. 1927 T. IX n° 5 p. 501-504 et 527.

72. Hoppe-Seyler. — Z. Phys. Chem. T. 16 p. 505. 1892.

73. — Arch. Pathol. Anatomie T. 23 p. 446. 1862.

74. Ilinski et Knorre. — Bull. Soc. Chim. T. 46 p. 510,

75. V. Jacobson. — J. am. med. ass. T. 73 p. 128.

76. Johnson et M. E. Hanke. Journ. of. biol. Chem 1936 T. 114 p. 157. C. R. Soc. Biol. 1936 2 p. 633.
Teneur en fer du sang et sa capacité à fixer l'oxygène.

77. Katsusmuna. — The journal of Oriental medicine 1927 T. 7 p. 217.

78. Kennedy. — Journ. of. Biol. Chem. 1927 T. 74 p. 385.

79 J. F. King et Howard F. H. — Détermination électrométrique du fer dans le sang Journ. of. Biol Chem. 1927 T. 75 n° 1 p. 27.

79 *bis*. Klump. — Journ. Biol Chem. 1934 T. 107 p. 213 n° 1.

80 J. Knope et O. Kubelkova. — Zeitschr. Analyt. Chem. 1931 T. 85 p. 407 428.
Ann. Chim. Anal. 1932 p. 185.

81. J. Knope, et B. Rothe et A. P. Solrinko. — Revue Brasil Chim. 1929 tome 1 p. 129-144.
Ann. Chim. Analyt. 1931 p. 148.

82. I. M. Korenmann. Microdosage rapide du fer. Microchem. 1934 T. 15 p. 315. J. Prikl. Khil. 1934 T. 7 p. 1092. Ann. Chim. anal. 1935 p. 111.

83. Kramer. — Zeitschr. f. Biol. 1934 (T. 95) p. 126.

84. Lasausse et L. Frograin. — Dosage iodométrique du fer dans le sang. J. Pharm. Chim. 1936 (8e S.) T. 23 n° 2 p. 82-84.

85. J. Lavollay. — Micro et submicrodosage colorimétrique du fer. Bull. Soc. Chim. Biol. 1935 T. XVII p. 432. Ann. Chim. Analyt. 1936 p. 14.

86. G. Leavell et N. R. Ellis. — Dosage du fer : Application au lait et au sang de la méthode à l'acide thioglycolique. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 1934 T. 6 p. 46.
Journ. Pharm. Chim. 1935 (8e S.) T. 21 p. 563.

87 Lorbeer - Biochem. Zeitschrift T. 181 p. 391-1927. Journ. Pharm. Chim. (8° S.) T. 8 p. 266. 1928.

87 *bis*. G. Litarczek et G. T. Dinischiotu — C. R. Soc. Biol. T. 114 p. 287. 1935.

88. W. D. Mac Farlane — Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 1936 (8) p. 124. Journ. Pharm. Chim. 1937, (8e S) T 25 p. 466.

89. A. L. Malkov. — J. Khim. Promycht 1931 T. 8 n° 1 p. 70. Ann Chim Analyt 1932 p 72.

90. Malvezin et Rivalland. — B. S. C. 1921 T. 29 p. 237.

91. L. Maquenne — Sur le dosage de petites quantités de fer B. Soc. Chim. T. 19 p 585 1921.

92. Max Jayle — Etude comparative de l'action peroxydasique de l'hémoglobine et des peroxydases végétales. B. Soc. Chim Biol. T. 20 p. 977 1938

93 P. Meunier. — Bull. Soc Chim. Biol T. 17 p. 548. 1935. — Bull. Soc Chim. Biol. T. 18 p. 113. 1936

94 Mohr. — Ann Chim. et Phys. (3e Ser) T. 18 p. 244. 1846

95 Neumann. — Zeitschrift f. Physiol. Chem. T. 37 1902

96. H. S. Newcomer. Absorption spectral of acid hematin oxyhaemoglobin, and carbon monoxydehaemoglobin. A new haemoglobinometer. J. Biol Chem. T. 37 p. 465. 1919.

97 H. S. Newcomer. — A new optical instrument for the determination of haemoglobin. J. Biol Chem. T. 55 p. 569 1923.

98. Newton Kugelmass — Bull. Soc. Chim. Biol IV p. 578 1922

99. Nicloux et Welter — Bull. Soc. Chim. Biol. T. 3 p 170. 1921.

100 A. Okac. — Chem. Listy 1932 T. 26 p. 595. Ann. Chim. Anal. 1933 p. 313.

101. W. W. Palmer — The colorimetric determination of haemoglobin. — J Biol. Chem. T. 33 p. 119 1918.

102. Paulais. — Art. de P. Meunier Bull. Soc. Chim. Biol. T. 17 p 548 1935.

103. Perls. — Virchow's arch. 1867 T. 39 p. 42.

104. N. W. Rakestraw, H. L. Mahvicke et E. E. Beach. — Ind. engl. chem. (analyst. Ed.) 1936 T. 8 p. 136 Journ. Pharm Chim. 1936 (9e S) p. 296 T. 21.

105. S. Rauschning — Milchwirtsch Forsch. 1934 T. 16 p. 549 — Ann. Chim Analyt. 1935 p. 222.

106. Reichert. — Das Haemometer nach Prof. Fleischl von Maxov Vienne 1889

107. F. Reis et H. H Chakmakjan — Dosage colorimétrique du fer dans le sang Journ Biol. Chem. 1931 T. 92 p. 59-63. Journ. Pharm Chim. 1932 8e S. T. 15 n° 1 p. 463.

108. J Ribereau-Gayon. — Ann. Falsif. Fraud. 1929 T. 22, p. 522.

109. Ribot. — Ann. chim. phys. 3e S. T. 30, p. 188

110. S. Rivas-Goday. — Bot. Farm. Mil. 1933, T. 11, p 369. Ann. Chim. Appl. 1934, p 370

111. Robscheit. — J. Biol. Chim. 1930. T. 81, p. 209

112. J. Roche. — C. R. Soc. Biol. 1932. N° 2, p. 1084.

112 *bis*. — J. Roche et P. Dubouloz. — C. R. Soc. Biol. 1933. T. 113 p. 317.

113. S. N. Rosanov, Markova et Fœderova. — Z. Pflanzennahr. u. düngung 1935 T. 41 p. 59. Ann. Chim. Appl. 1936 p 215

114. Rupp. — Zeitsch Anal. Chemie 1932 T. 86 p. 217.

115. Saneyoshi. — Biochem. Zeitsch. 1914 T. 59 p. 339.

116. C. Scagliarini et P. Patresi — Ann. Chim. Applic. 1929 T. 19 n° 2 p. 85. Ann. Chim. analyt. 1930 p. 23.

116 *bis*. Schenck. — Arch. f. Exp. Path. u. Pharmak. 1930 T. 150 p. 160.

117. Schmiedeberg. — Arch. f Exp. Path. 1894 T. 33 p. 101.

118. W. Scholz. — Ann. Chim. Analyt. 1933 p. 333. Z. Pflanz. dung. 1932 T. 26 p. 212.

119. H. Schulten. — Munch. Med. Wochen n° 26 du 30-6-1933.

120. L. Servantie. — Dosage du sang dans les anémies. Bull. Tr. Soc. Pharm. Bordeaux, 75e année, fasc. IV, 1937, p. 211.

121. Shorland et Wall. — Méthode rapide du dosage du fer dans le sang. - Bioch. Jour. C XXX. p. 1047. 1936. - Journ. Phys. et Path. génér., 1937. T. 35, p. 467.

122. S. F. Smith et H. H. Bliss. — J. Amer. Soc. 1931. T. 53. N° 12, p. 4291. — Ann. Chim. Appl. 1932, p. 366.

123. L. Stuckert et F. W. Meser. — Sprechsaal 1925. T. 68, p. 527.

124. Swift. — Journ. amer. Chem. Soc. 1929. T. 51, N° 9, p. 2682. — Journ. Pharm. Chim. 1930. 8e S, T. 12, p. 177. Ann. Chim. Analyt. 1930. N° 2, p. 174.

125. L. Szegoed et B. Cassoni. — Giorn. Chem. ind. appl. 1933. T. 15. p. 281. — Ann. Chim. Appl. 1934, p. 188.

126. N. Teletoff et N. Andronikov. — Bull. Soc. chim. biol. 1929. N° 7. p. 674. (tome XII)

127. Van Slyke et Hiller. — J. Biol. Chem. T. 78, p. 807. 1928.

128. J. Waddell, H. Steenbook, E B. Hart. — J. Biol. Chem. 1929. T. 84, p. 115.

129 L. W. Winkler. — Pharm. Zentralhalle 1933 T. 74, p. 129 Ann. Chim. analyt. 1933, p. 462.

130. C. S. Williamson. — Arch. int. med. 1916. T. 18, p. 505.

131. Wong (San Yin). — Journ. of biol. chem. 1923. T. 54, p. 421 et 1928. T. 77, p. 409.

132. Wu (H.) — J. Biochem. Japan 1922. T. 11, p. 173.

133. Wu (H.) — An ultra micromethod for the determination of haemoglobin as a peroxydase. J. Biochem. Japan. T. 11, p. 189. 1922.

134. W. L. Dulière et M. Adant. — Bull. Soc. chim. biol. T. XVIII, N° 11, p. 1589. 1936.

135. D. Fraser. — Journ. of Physiol. T. 61, p. 20. 1926.

136 J. Paviot, R. Chevallier et L. Revol. — Nouveau procédé colorimétrique de dosage de minimes quantités de fer. C. R. Soc. Biol. T. 99, p. 1749. 1928.

137. A. Blanchetière et A. Cardot. — C. R. Soc. Biol. 1924. T. 90, p. 1017.

138. Lyons. — Journ. amer. chem. soc. 1927. T. 49, p. 1916.

139 Haurovitz. — Zeitsch. Physiol. Chem. 1935. T. 232. p. 125

Vu, Strasbourg, le 3 Décembre 1938

Le Président du Jury,

Y. VOLMAR

Vu et approuvé :

Strasbourg, le 6 Décembre 1938

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie

A. SARTORY

Vu et permis d'imprimer :

Strasbourg, le 10 Décembre 1938

Le Recteur de l'Académie

Président du Conseil de l'Université

R. TERRACHER